

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TARCILA BUENO

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA FORMULAÇÃO DE ADITIVO
PROBIÓTICO COMPOSTO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtillis* B-3666,
UTILIZANDO SUBPRODUTOS DAS INDÚSTRIAS DE SOJA E CANA, COM
APLICAÇÃO NO SETOR DE NUTRIÇÃO ANIMAL

CURITIBA

2018

TARCILA BUENO

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA FORMULAÇÃO DE ADITIVO
PROBIÓTICO COMPOSTO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtillis* B-3666,
UTILIZANDO SUBPRODUTOS DAS INDÚSTRIAS DE SOJA E CANA, COM
APLICAÇÃO NO SETOR DE NUTRIÇÃO ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito para à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Agroalimentar e Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Coorientadora: Dr^a Sandra Regina Barroso Ruíz Sella

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR Biblioteca de Ciência e Tecnologia

B928d

Bueno, Tarcila

Desenvolvimento de bioprocesso para formulação de aditivo probiótico composto de esporos de *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666, utilizando subprodutos das indústrias de soja e cana, com aplicação no setor de nutrição animal / Tarcila Bueno. – Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, 2018.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol – Coorientador: Sandra Regina Barroso Ruíz Sella.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Probióticos. 3. Avicultura. 4. Soja. 5. Cana-de- açúcar. 6. Melaço. I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Sella, Sandra Regina Barroso Ruíz. IV. Título.

CDD: 615.329

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TARCILA BUENO** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA FORMULAÇÃO DE ADITIVO PROBIÓTICO COMPOSTO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* natto B3666, UTILIZANDO SUBPRODUTOS DAS INDÚSTRIAS DE SOJA E CANA, COM APLICAÇÃO NO SETOR DE NUTRIÇÃO ANIMAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Setembro de 2018.

CARLOS RICARDO SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo

SANDRA REGINA BARROSO RUIZ SELLA
Avaliador Externo

GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA
Avaliador Interno

VANETE THOMAZ SOCCOL
Avaliador Interno

AGRADECIMENTOS

Durante toda esta imensa trajetória, deixo aqui meus sinceros agradecimentos e por mais que queira aqui expressar, as palavras não representarão tamanha gratidão que sinto neste momento.

Primeiramente ao nosso grande Deus, meu pai eterno, pela vida, pelas bênçãos, pela força e coragem de cada dia encarar este desafio de forma responsável e consciente para a concretização deste sonho.

À minha família. Meus pais, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão. Ao meu irmão e minha cunhada pelo apoio, torcida e orações.

Em especial, ao pequeno Pedro Vinícius, minha motivação diária... a você, meu filho, que deste os quatro anos teve que “entender” o que era um “doutorado”... e apesar de muito pequeno, ainda compreensivo de que esta missão precisava ser cumprida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, mentor deste projeto, agradeço pelas ideias, ensinamentos, críticas, sugestões, contribuições e correções, pela aceitação da incumbência de fornecer conhecimentos específicos em resposta às demandas da comunidade, transformando o saber em uma ferramenta para o benefício direto da sociedade.

À minha co-orientadora, Dr^a Sandra Regina Barroso Ruíz Sella, pelas horas dispensadas com orientação, ensino, discussões, incentivo. Agradeço muito, por ter aceito estar comigo junto, nesta caminhada. Pela compreensão, por me fazer aprender com sua experiência e me motivar a desenvolver um espírito crítico no desenvolvimento de um bom trabalho.

Ao grande amigo e parceiro de pesquisa Ângelo Augusto Buturi de Oliveira, pela colaboração, apoio, dedicação. Agradeço imensamente, pela sua companhia, pela amizade (um grande presente), pelas horas de convivência, por caminhar comigo abraçando com tanto amor esta pesquisa!

À Universidade Federal do Paraná, especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, pela oportunidade da realização deste doutorado.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por todos os ensinamentos, incentivo e apoio. Agradeço especificamente ao professor Júlio Cesar de Carvalho em seu papel de coordenação, sempre me auxiliando com as documentações.

Aos técnicos do laboratório, Mityo, Otacílio e Natasha.

À querida secretária do programa de pós-graduação, Marta Szadkoski, sempre atenciosa, positiva, prestativa e solidária.

Aos amigos e colegas que construímos no programa de pós-graduação pela amizade, dicas e contribuições.

Ao Instituto Federal do Paraná, pelo reconhecimento da importância do investimento na melhoria contínua da qualificação técnica e científica de seus profissionais, como garantia de um fornecimento da educação pública e de qualidade.

Aos meus queridos colegas e parceiros de trabalho do Instituto Federal do Paraná (Daniele, Luiz, Natan, Livia, Catharina, Alex, Fran, Douglas, Ana Paula, Elielton, Ana Cristina, Luciano, Jeff, Gislaine, Fábio Lucas) entre outros, pela amizade, parceria e incentivo. Agradeço especificamente ao diretor geral, Paulo Sergio Horst, e ao diretor de ensino Pedro Francisco Cataneli que sempre estiveram ao meu lado e me deram imenso apoio na licença afastamento para execução do doutorado.

Aos meus alunos do Instituto Federal do Paraná, pelo tempo que estivemos juntos, pelo carinho, porque também aprendi e aprendo muito com vocês.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos-CPPI, representado pela direção do Dr. Sérgio Túlio Stingen, que juntamente com seus colaboradores me acolheram e gentilmente cederam espaço físico, equipamentos e reagentes em contribuição à esta pesquisa. Especificamente, agradeço à Elza R. Mendes pelo auxílio com o preparo dos frascos de diluição, ao André pela manutenção dos equipamentos, ao Dr João Carlos Minozzo e Rubens Gusso pelo encorajamento diário e amizade.

Ao meu colega de laboratório Maurício José Fernandes e à professora Maria Giovana Binder Pagnoncelli, por gentilmente terem me cedido a Cepa *B. subtilis var. natto* B-3666.

Ao Laboratório Central do Estado-Lacen pela colaboração com as análises complementares da cepa.

À banca examinadora desta tese, agradeço a cada um por aceitar o convite, por suas críticas e contribuições que nos fazem crescer como pesquisadores.

Agradeço também aos que uma alguma forma contribuíram para a realização deste estudo. A todos, muito obrigada!

RESUMO

No Brasil e no mundo observa-se um aumento na produção pecuária e também na produção de frangos. Na avicultura industrial moderna, o sistema artificial de produção afeta o desenvolvimento da flora intestinal dos animais de forma marcante, pela falta de contato com uma microbiota natural. O uso de antibióticos com a finalidade de obter ganho de peso e de melhorar a conversão alimentar evoluiu para uma aplicação generalizada na indústria de alimentação animal, causando problemas de segurança alimentar e resistência microbiana. Neste sentido, os probióticos são uma alternativa segura e proeminente ao uso de antibióticos, em virtude de benefícios à saúde, segurança e melhora de desempenho. Os produtos disponíveis no mercado possuem em sua formulação ingredientes sintéticos, o que dificulta a aplicação em larga escala. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir um aditivo probiótico composto de esporos de *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666, por meio do desenvolvimento e otimização de bioprocessos, que utiliza subprodutos agroindustriais de soja e cana (abundantes na região sul do Brasil), visando a obtenção de um produto de baixo custo, alta qualidade, gerado em um processo de alta produtividade, com aplicabilidade no setor avícola e demais setores agropecuários. Na primeira etapa foi realizada a avaliação dos diferentes resíduos e subprodutos da agroindústria na composição do meio de esporulação, por fermentação de estado sólido, em escala laboratorial, com o objetivo de a seleção de substrato e suporte, baseados em parâmetros como disponibilidade, custo e produtividade. Os melaços de soja e cana, como substrato, e a casca de soja como suporte, forneceram uma produtividade de $2,9 \times 10^{10}$ UFC/g massa de seca em 96 horas de cultivo. Posteriormente, foi realizada a otimização das principais variáveis do processo, através de uma sequência de planejamentos experimentais, com a utilização de, paralelamente, os substratos: melaço de soja e melaço de cana. Os resultados foram de $9,7 \times 10^{13}$ UFC/g de massa seca para o substrato melaço de soja e $6,9 \times 10^{12}$ UFC/g de massa seca para o substrato melaço de cana, com adição de extrato de levedura (3g%) e milhocina (3g%), respectivamente, como fontes de nitrogênio. A etapa de escalonamento foi conduzida somente com o melaço de cana, em virtude de sua maior disponibilidade comercial. Foram avaliados diferentes tipos de biorreatores (bandeja, vidro e saco plástico ou *bag*), o processo escalonado foi otimizado e validado, e a cinética de esporulação determinada. O reator tipo bandeja forneceu a maior produtividade de esporos, $2,3 \times 10^{13}$ UFC/g de massa seca em 48 horas de cultivo, pH inicial $7,0 \pm 0,5$ e umidade inicial 65%, altura do leito 3,0 cm. O produto final foi caracterizado quanto ao perfil bioquímico da cepa, e estudos de estabilidade. As características principais da cepa foram mantidas e a quantificação de esporos conservou-se por até 60 dias (tempo máximo do estudo). O processo desenvolvido, foi otimizado em 03 logs, sendo inovador, com custos de matéria prima de produção estimados em R\$1,10. Não foram encontrados processos análogos descritos na literatura, de alta produtividade, e o valor obtido foi superior ao de produtos similares disponíveis no mercado.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis* B-3666. Probióticos. Avicultura. Aditivos. Fermentação em estado sólido. Melaço de cana. Melaço de soja. Casca de soja.

ABSTRACT

In Brazil and in the world has been regarded that livestock production has increased and the poultry production too. In modern broiler industry, the artificial production system affects strongly the development of the intestinal flora of the animals, by the lack of contact with a normal microflora. The use of antibiotics in order to obtain weight gain and improving feed conversion has evolved into a broad application in the animal feed industry, causing safety problems and microbial resistance. In this way, probiotics are safe and prominent alternative to the use of antibiotics because of health benefits, safety and performance improvement. The commercially available products have synthetic ingredients in its formulation, hampering the scale up application. Therefore, the aim of this work was to produce a probiotic additive compound of spores of *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666, through the development and bioprocess optimization, using agro-industrial by-products of soy and sugar cane (abundant in southern Brazil), in order to obtain a low-cost product, high quality, generated in a high productivity process with applicability in the poultry industry and other agricultural sectors. In the first step, the evaluation of different waste and agricultural by-products on sporulation medium composition by solid state fermentation on a laboratory scale was performed, aiming the substrate and support selection based on criteria such as availability, cost and productivity. The soy and sugar cane molasses as substrate and soybean hulls as support, provide a 2.9×10^{10} CFU/g dry weight yield in 96 hours of cultivation. Afterwards, the optimization of process variables was performed through a sequence of experimentais designs, using in parallel, soy molasses and cane molasses substrates. The yield results were 9.7×10^{13} UFC/g dry weight for the soy molasses substrate and 6.9×10^{12} UFC / g dry mass to cane molasses substrate with added yeast extract (3g%) and corn steep liquor (3g%) respectively as nitrogênio sources. The scale up has been conducted only with cane molasses, by virtue of their greater commercial availability. Different types of bioreactor was evaluated (tray, glass and plastic *Bag* or bag), the scale up was optimized and validated, and the kinetic sporulation was performed. The tray-type reactor provided the highest spore yield, 2.3×10^{13} CFU/g dry weight in 48 hours of cultivation, initial pH 7.0 ± 0.5 and 65% initial moisture, bed height 3.0 cm. The final product was characterized as the biochemical strain profile, and stability studies. The main characteristics of the strain were maintained and the spore quantification was maintained for up to 60 days (maximum study time). The process developed has been optimized in 03 logs, being innovative, with production raw material costs estimated at R\$ 1.10, as there is not others procedures described in the literature, has high yield, and the value obtained was higher than similar products available on the market.

Key words: *Bacillus subtilis* B-3666. Probiotics. Poultry industry. Additive. Solid state fermentation. Cane molasses. Soy molasses. Soybean hull.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 - PRODUÇÃO MUNDIAL DE FRANGOS NO PERÍODO DE 1961 A 2016	20
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRODUTO PROBIÓTICO CONSTITUÍDO DE ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i> , OBTIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	23
FIGURA 3 - PATENTES DE PROBIÓTICOS REGISTRADAS NO MUNDO NO PERÍODO DE 1988 A 2017	27
FIGURA 4 - PUBLICAÇÕES REFERENTES ÀS PALAVRAS CHAVES “ <i>Bacillus</i> + PROBIOTIC” AND “ <i>Lactobacillus</i> + PROBIOTIC” DE 1992 a 2017 (parcial).....	27
FIGURA 5 - UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ESPORULADAS DE <i>Bacillus</i> COM FINALIDADE PROBIÓTICA	31
FIGURA 6 - PATENTES DEPOSITADAS NO PERÍODO DE 1988 A 2017 REFERENTES AO PROBIÓTICOS DO GÊNERO <i>Bacillus</i>	33
FIGURA 7 - PATENTES REFERENTES A PROBIÓTICOS COM O GÊNERO <i>Bacillus</i>	33
FIGURA 8 - AUTORIA DAS PATENTES DE PRODUTOS PROBIÓTICOS COM FORMULAÇÃO A BASE DE <i>Bacillus</i> sp. DEPOSITADAS NO MUNDO NO PERÍODO DE 1988 A 2013	34
FIGURA 9 - APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO <i>Bacillus subtilis</i>	41
FIGURA 10 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO <i>Bacillus subtilis</i>	42
FIGURA 11 – (A) NATTO: TRADICIONAL ALIMENTO JAPONÊS PRODUZIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SOJA POR <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Bacillus subtilis</i> ISOLADO DO NATTO. (C) COLORAÇÃO DE GRAM DE CÉLULAS DE <i>Bacillus subtilis</i> (AUMENTO DE 1000 VEZES).....	43
FIGURA 12 – AÇÃO DO NATTO E DA NATTOKINASE NA DISSOLUÇÃO DE FIBRINA (HALO SEMITRANSARENTE). (1–5) GRÃOS DE SOJA FERMENTADOS (NATTO); (6) CARACTERÍSTICA DO MATERIAL VISCOSO DE NATTO; (NK) NATTOKINASE COMERCIAL (100 µg) COMO CONTROLE POSITIVO; SOJA NÃO FERMENTADA E PBS (SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATO) COMO CONTROLES NEGATIVOS.....	43
FIGURA 13 - PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR E FORMAÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS	46
FIGURA 14 – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DO ENDÓSPORO E DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>natto</i> E SUA GERMINAÇÃO	48
FIGURA 15-MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE DE CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO. CÉLULAS DE <i>Bacillus subtilis</i> EM ESTÁGIO AVANÇADO DE ESPORULAÇÃO EM QUE É POSSÍVEL VISUALIZAR OS ESPOROS COM O BRILHO CARACTERÍSTICO DENTRO DOS ESPORÂNGIOS.	48
FIGURA 16- FATORES QUE DEFINEM OS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO- SÓLIDO (FES).....	50
FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES EM DIFERENTES SUBSTRATOS.....	87
FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES FRENTE A DIFERENTES SUPORTES, EM DIFERENTES pHs.	88
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DO USO DOS SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DA CANA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES.	89
FIGURA 20 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DO <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE CASCA DE SOJA COMO SUPORTE E MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	90
FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO DOS RESULTADOS PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	105
FIGURA 22 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR	107
FIGURA 23 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DE ESPORULAÇÃO, CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA E pH DO SUBSTRATO.	109
FIGURA 24 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DA OTIMIZAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR DCCR A 95% DE CONFIANÇA.....	111

FIGURA 25 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING)	111
FIGURA 26- CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	113
FIGURA 27 - FILTRADOS DAS FERMENTAÇÕES DAS FONTES DE NITROGÊNIO (3%), COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA 3%, INÓCULO 12% (OBTIDOS DA FÓRMULA DE OTIMIZAÇÃO) E CASCA DE SOJA COMO SUPORTE. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, TEM-SE: SEM FONTE (A)(B), MILHOCINA (A)(B), EXTRATO DE LEVEDURA(A)(B), E GLUTAMATO (A)(B).	114
FIGURA 28 - DIAGRAMA DE PARETO DOS RESULTADOS PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	117
FIGURA 29 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA.	119
FIGURA 30 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA.	121
FIGURA 31 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) , COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	123
FIGURA 32 – PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	125
FIGURA 33- CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	125
FIGURA 34 – DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA	142
FIGURA 35 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES EM BANDEJAS PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING).....	143
FIGURA 36 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES, EM BANDEJA COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	145
FIGURA 37 – CINÉTICA DA SECAGEM DO FERMENTADO À 45°C	156
FIGURA 38 - SECAGEM DO FERMENTADO A 45°C.	156
FIGURA 39 - FERMENTADO SECO (A) E FERMENTADO PÓS MOAGEM.	157
FIGURA 40 - TESTE DA CATALASE. (A): <i>Streptococcus aureus</i> ; (B) <i>Bacillus subtilis</i> B-3666	160
FIGURA 41- TESTE DE HEMÓLISE. (A) <i>Bacillus subtilis</i> B-3666; (B) <i>Streptococcus pyogenes</i>	160

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

QUADRO 1 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO E DOSE DE USO EM AVES DE PROBIÓTICOS CONTENDO <i>Bacillus sp.</i>	37
QUADRO 2 - PRINCIPAIS BENEFÍCIOS DA INGESTÃO DE PROBIÓTICOS DE <i>Bacillus subtilis</i> .	38
QUADRO 3 - EFEITOS DA INGESTÃO DE <i>Bacillus subtilis</i> EM FRANGOS DE CORTE.....	39
QUADRO 4 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO ...	51
QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E RENDIMENTO DE ESPOROS DE PROCESSOS DE FES COM A UTILIZAÇÃO DE <i>Bacillus</i>	52
QUADRO 6 - CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DOS PRODUTOS PROBIÓTICOS	63
QUADRO 8 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO	114
QUADRO 9 - DESCRIÇÃO SUMÁRIA DOS ENSAIOS REALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis var. subtilis</i> B-3666 USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	115
QUADRO 10 - DESCRIÇÃO SUMÁRIA DOS ENSAIOS REALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis var. subtilis</i> B-3666 COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO	126
QUADRO 11 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO	127
QUADRO 12 - RENDIMENTOS OBTIDOS PELOS REGIMES DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA	131
QUADRO 14 - CUSTOS DE MATÉRIA PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE 1,0 KG DO	161
QUADRO 15 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES.	170

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 - PROBIÓTICOS APLICADOS À AGROINDÚSTRIA DISPONÍVEIS NO MERCADO E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	40
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS ENTRE ENDÓSPOROS E CÉLULAS VEGETATIVAS	49
TABELA 3 - ESPECIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA CASCA DE SOJA.....	53
TABELA 4- COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA DE FARELO DE SOJA DESENGORDURADO.....	54
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA	54
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E TEOR DE CINZAS E UMIDADE DO MELAÇO DE SOJA LÍQUIDO E DO MELAÇO DE CANA EM PÓ	56
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE CANA.....	57
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DA MILHOCINA (<i>corn steep liquor</i>).....	59
TABELA 9- ESPORULAÇÃO DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR GRAMA DE FARELO	86
TABELA 10- ESPORULAÇÃO DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO E DIFERENTES SUPORTES, TEMPO DE INCUBAÇÃO 5 DIAS.....	87
TABELA 11- ESPORULAÇÃO DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS E CASCA DE SOJA COMO SUPORTE, TEMPO DE INCUBAÇÃO 5 DIAS.....	88
TABELA 12- VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL Plackett-Burman.....	101
TABELA 13- NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	101
TABELA 14 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	102
TABELA 15 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	102
TABELA 16 - AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR PB (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL Plackett Burman) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.	104
TABELA 17 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PB (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL Plackett Burman) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.	105
TABELA 18 - MATRIZ DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) E RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO	106
TABELA 19 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PRIMEIRO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO	106
TABELA 20 - RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) - NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO	108
TABELA 21 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO SEGUNDO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	108
TABELA 22 -RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES.....	110
TABELA 23 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DA OTIMIZAÇÃO POR DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	110
TABELA 24 – VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	112

TABELA 25 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO AO PROCESSO OTIMIZADO	113
TABELA 26 – AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO	116
TABELA 27– ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	116
TABELA 28 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.	118
TABELA 29 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PRIMEIRO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO	118
TABELA 30 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING)- NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.	120
TABELA 31 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO SEGUNDO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	120
TABELA 32 - RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i>	122
TABELA 33 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DA OTIMIZAÇÃO POR DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	122
TABELA 34 – VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	124
TABELA 35 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	124
TABELA 36 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	140
TABELA 37 - PRODUÇÃO DE ESPOROS <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 EM REATOR VIDRO, BANDEJA E Bag.....	141
TABELA 38 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) E RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES EM BANDEJA	141
TABELA 39 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 PRODUZIDOS POR FES EM BANDEJA	142
TABELA 40 – VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.....	144
TABELA 41 - CINÉTICA DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE pH, UMIDADE E PRODUÇÃO DE ESPOROS NO REATOR TIPO BANDEJA.....	144
TABELA 42 CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO E BANDEJA COMO BIORREATOR	145
TABELA 43 - ESTRATIFICAÇÃO DO FERMENTADO PÓS-MOAGEM DE ACORDO COM O	157
TABELA 44 – ESTABILIDADE DO PRODUTO APÓS SECAGEM A 45 °C, CONSERVADO À TEMPERATURA AMBIENTE.	157
TABELA 45 - PERFIS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS DE <i>Bacillus subtilis</i>	158
TABELA 46 - PERFIS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS DE <i>Bacillus subtilis</i> B-3666 MODIFICADOS PÓS-FERMENTAÇÃO.....	159

LISTA DE SIGLAS

ACP	Fosfatase ácida
AGROPREVINE	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CENBAPAR	Centro de Biotecnologia Agroindustrial do Paraná
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DHCR24	β -hidroxiesteróide-redutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPA	Ácido dipicolínico
DPA-Ca ²⁺	Ácido piridina-2,6-dicarboxílico e cátions divalentes associados
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and drug administration
FES	Fermentação em estado sólido
GR	Glutathione redutase
GRAS	Generally recognized as safe
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
Ldh	Lactato desidrogenase
MAPA	Ministério da agricultura e pecuária
ml	mililitro
MOS	Mananoligossacarídeo
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
OMS	Organização mundial de saúde
PB	Plackett–Burman design
RPM	Rotações por minuto
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidades formadoras de colônias

UFPR	Universidade Federal do Paraná
USP	United States Pharmacopeial
UV	Ultravioleta
XO	Xantina oxidase
γ PGA	Ácido poli- γ -glutâmico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	ESTRUTURA DA TESE.....	21
	OBJETIVO GERAL	24
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
	CAPÍTULO I.....	25
2.	REVISAO DA LITERATURA.....	25
2.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	25
2.2	PROBIÓTICOS: HISTÓRICO, DEFINIÇÃO E CENÁRIO ATUAL	26
2.3	O PAPEL DOS ALIMENTOS PROBIÓTICOS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL.....	29
2.4	USO DE ESPOROS DO GÊNERO <i>Bacillus</i> COMO PROBIÓTICO	31
2.5	EFEITOS PROBIÓTICOS ASSOCIADOS À INGESTÃO DE <i>Bacillus subtilis</i>	34
2.6	MERCADO DE PROBIÓTICOS	39
2.7	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i>	41
2.8	PROCESSO DE ESPORULAÇÃO	45
2.9	ESTRUTURA DOS ESPOROS DE <i>B. subtilis</i>	46
2.10	O USO DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS.....	49
2.11	. RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DA AGROINDUSTRIA UTILIZAVEIS COMO MEIOS DE FERMENTAÇÃO	52
2.12	CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO PROBIOTICO	60
2.13	- CONCLUSÃO	64
3.	SELEÇÃO DE SUBSTRATO E SUPORTE PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DA SOJA E CANA.....	82
3.1	INTRODUÇÃO	82
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
3.3	RESULTADOS.....	86
3.4	DISCUSSÃO.....	90
3.5	CONCLUSÃO	93
4.	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666, POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA E MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO E FRASCO DE VIDRO COMO BIORREATOR	98
4.1	INTRODUÇÃO	98
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	99
4.3	RESULTADOS	104
4.4	DISCUSSÃO.....	128
4.5	CONCLUSÃO	131

5.	PRODUÇÃO EM ESCALA PILOTO DE ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>subtilis</i> B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES BIORREATORES.....	137
5.1	INTRODUÇÃO	137
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	138
5.3	RESULTADOS	141
5.4	DISCUSSÃO.....	146
5.5	CONCLUSÃO	149
6.	FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO PROBIÓTICO	152
6.1	INTRODUÇÃO	152
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	153
6.2.1	Secagem, moagem e estabilidade pós-moagem	153
6.2.2	Caracterização do produto.....	154
6.2.3	Viabilidade econômica.....	155
6.3	RESULTADOS	155
6.3.1	Análise de custos.....	160
6.4	DISCUSSÃO.....	162
6.5	CONCLUSÃO	165
7.	CONCLUSÕES FINAIS.....	169
8.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	172
	REFERÊNCIAS.....	172

1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo observa-se um crescimento na produção pecuária e particularmente na produção de frangos. Este cenário é decorrente de fatores como o crescimento na demanda, alta competição com os demais setores de proteína animal, aumento na produtividade em função do melhoramento genético, nutrição e manejo, e a tendência ao consumo de carnes mais saudáveis.

Na avicultura industrial moderna, por exemplo, o sistema artificial de produção afeta o desenvolvimento da flora intestinal dos animais de forma marcante, pela falta de contato com uma microbiota natural. Para contornar esta situação, são utilizados os chamados "promotores de crescimento", que, geralmente, são drogas antibióticas utilizadas de forma constante na ração, em doses subterapêuticas. Todavia, o uso de antibióticos com a finalidade de obter ganho de peso e de melhorar a conversão alimentar que ocorreu inicialmente de forma discreta, evoluiu seguidamente para o vasto uso generalizado na indústria de alimentação animal. Esta situação levou ao aparecimento de microrganismos resistentes aos diferentes medicamentos usados para favorecer o crescimento e a produção animal (LANCINI, 1994).

Ainda que a associação entre o uso de antibióticos nas unidades de produção animal, a seleção de microrganismos resistentes e a sua transferência à população humana não sejam explícitas, vários estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de derivados animais seja uma possível via de transmissão de bactérias resistentes. Estes indícios levaram as organizações ligadas à saúde humana e animal a recomendar prudência no uso de tais compostos (CASA DEI, 2012; MARSHALL & LEVY, 2011).

Com a restrição de uso de antibióticos na alimentação animal, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de substituir os antimicrobianos por outros constituintes, como prebióticos, probióticos, extratos de plantas (extrato de alho, de noz moscada, de canela) e acidificação da água. Neste âmbito, os estudos envolvendo os probióticos têm recebido atenção, pois é evidenciado que estes agentes são uma alternativa natural e segura de obter produtos para a nutrição que propiciem saúde e qualidade de vida para os animais e consumidores, por meio do aumento da quantidade da atividade dos microrganismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro (FULLER, 1989).

Estes microrganismos desempenham um importante papel na regularização e o equilíbrio da microbiota intestinal, agindo por mecanismos de competição, ação antioxidante, antimicrobiana e imunomodulatória (LEFEVRE; RACEDO; RIPERT, 2015). Apesar de ser um mercado promissor, torna-se um grande desafio a produção destes insumos com baixo custo, em altas concentrações e grandes escalas para utilização na agroindústria.

Um dos primeiros probióticos utilizados como aditivo na alimentação animal foi o *Bacillus cereus*, porém outros microrganismos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi* e *Bacillus bifidum* podem ser utilizados combinados, ou com sua atividade isolada. Também é reportado a produção de agente probióticos caracterizados pela associação de bacilos com leveduras, enzimas e outros agentes (COOK et al., 2012). Mais especificamente, cabe aqui ressaltar a utilização do *Bacillus subtilis*, apontado como agente probiótico no setor avícola, o qual destaca-se por características robustas de resistência e termoestabilidade na forma esporulada, ou seja, oferece maior tolerância a ácidos e melhor estabilidade durante o processamento térmico e durante o período de armazenamento a baixas temperaturas (VAZQUEZ, 2016).

No entanto, o uso de esporos bacterianos como probiótico para animais ainda é pouco difundido no Brasil, assim sendo, a produção de compostos com ação probiótica é campo com cenário promissor, reforçado pela a prospecção do mercado de insumos de alimentos funcionais produzidos por esporos bacterianos com ação probiótica, e, principalmente considerando a demanda crescente da produção avícola mundial (FIGURA 1).

Particularmente, no setor de aves, onde os animais são abatidos com poucos dias de vida, a suplementação com probióticos promove ganho de peso, melhora da conversão alimentar, diminuição da mortalidade e, de forma geral, melhora da saúde (JUNG et al., 2008; VAZQUEZ, 2016).

FIGURA 1- PRODUÇÃO MUNDIAL DE FRANGOS NO PERÍODO DE 1961 A 2016



FONTE: FAO (2018)

Demais setores de produção agropecuária também tem aderido ao uso de probióticos com a finalidade de obterem maiores rendimentos, e principalmente que visa a segurança alimentar. No ano de 2017, o Ministério da Agricultura (Mapa) criou o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Resistência a Antimicrobianos na Agropecuária (AgroPrevine) tendo em vista equiparar o país, atualizando-o com o que vem ocorrendo no resto do mundo há mais de uma década no controle efetivo do uso de antibióticos, dado que a tendência global é restringir o uso do medicamento apenas para o tratamento de enfermidades dos animais destinados ao consumo humano, reincidento o seu uso como promotores de crescimento e de engorda, sobretudo nos setores de criação de bovinos, suínos e aves (MELO, 2018).

Desta forma, a produção de um aditivo probiótico de baixo custo e alta qualidade, composto de esporos de *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 por meio do desenvolvimento e otimização de bioprocessos que utiliza resíduos e subprodutos agroindustriais, gerado em um processo de alta produtividade, possui grande aplicabilidade no setor de insumos agropecuários e principalmente no setor avícola.

Para a produção do aditivo em larga escala, observa-se que a aplicação de conceitos como minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos é cada vez mais proeminente e necessária na promoção de

processos sustentáveis. Neste sentido, considerando o aproveitamento e valorização de resíduos e subprodutos agroindustriais, optou-se pela fermentação sólida, uma vez que o processo é uma alternativa biotecnológica com redução de impacto ambiental. Adicionalmente, na maioria dos casos, este regime de fermentação propicia maiores rendimentos e redução de custos no âmbito industrial (LIMA, 2009; OOSTRA et al., 2001).

1.1 ESTRUTURA DA TESE.

O presente trabalho foi estruturado em quatro capítulos, que descrevem todas as etapas do desenvolvimento e otimização do bioprocesso, escolha de biorreator e caracterização do produto final:

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro capítulo apresenta a revisão de literatura, onde são abordados os fundamentos relacionados aos alimentos funcionais e em particular ao uso de probióticos, sua importância no agronegócio e os seus benefícios para a saúde humana e animal.

CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE SUBSTRATO E SUPORTE PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS *Bacillus subtilis* var. *subtillis* B-3666 POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DA SOJA E CANA

O segundo capítulo apresenta a avaliação dos diferentes resíduos e subprodutos da agroindústria na composição do meio de esporulação de *B. subtilis* var. *subtillis* B-3666, por fermentação de estado sólido com o objetivo de selecionar de substrato e suporte, baseados em parâmetros como disponibilidade, custo e produtividade.

CAPÍTULO III – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtillis* B-3666, POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA E MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO EM FRASCO DE VIDRO COMO BIORREATOR

O terceiro capítulo apresenta a otimização das principais variáveis significativas da fermentação em estado sólido, através de uma sequência de planejamentos experimentais (*Plackett and Burman* -PB e delineamento composto central rotacional -DCCR), com a utilização de fontes de substrato selecionadas, visando obter o máximo rendimento da produção de esporos bacterianos.

CAPÍTULO IV – PRODUÇÃO EM ESCALA PILOTO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES BIORREATORES

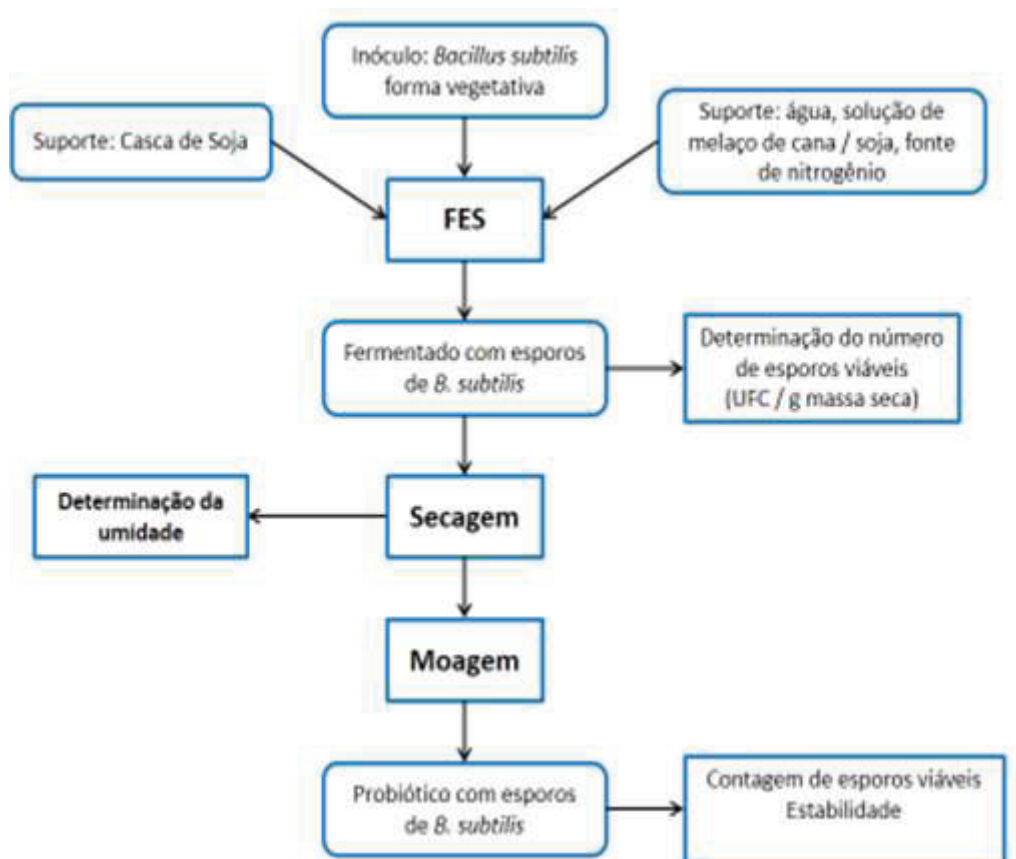
O quarto capítulo aborda os experimentos da primeira etapa de escalonamento do processo produtivo através da avaliação de diferentes tipos de biorreatores, otimização do processo escalonado, validação do processo otimizado e determinação da cinética de esporulação nestas condições.

CAPÍTULO V – CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

O quinto capítulo apresenta a caracterização do produto final, quando foram determinadas as características bioquímicas da cepa pré e pós fermentação e realizados estudos de estabilidade ao processo de secagem, resistência ao processo de moagem e estabilidade pós moagem. A caracterização da cepa, realizada pelas provas de identificação bacteriana, é necessária para caracterização do produto e avaliação de sua biossegurança, como a comprovação da não patogenicidade.

O fluxograma da Figura 2 contém uma demonstração sucinta das principais etapas que foram analisadas e otimizadas do processo para a obtenção de probiótico constituído de esporos de *B.subtilis*.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRODUTO PROBIÓTICO CONSTITUÍDO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis*, OBTIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).



FONTE: O AUTOR (2018)

OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa é a produção de um aditivo probiótico composto de esporos de *B. subtilis var. subtilis* B-3666, por meio do desenvolvimento e otimização de bioprocessos que utiliza subprodutos agroindustriais de soja e cana (abundantes na região sul do Brasil), que visa a obtenção de um produto de baixo custo, alta qualidade, gerado em um processo de alta produtividade, com aplicabilidade no setor avícola e demais setores agropecuários.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os subprodutos de maior relação custo/produtividade para utilização como substrato/suporte;
- Determinar as condições ideais de produção de esporos por meio da avaliação das variáveis químicas e físicas do processo;
- Desenvolver e otimizar a produção de esporos, de forma a obter maior concentração no produto final;
- Executar a primeira etapa de escalonamento e iniciar a caracterização do probiótico;

CAPÍTULO I

2. REVISAO DA LITERATURA

Neste capítulo, são abordados os fundamentos relacionados aos alimentos funcionais e em particular ao uso de probióticos, sua importância no agronegócio e os seus benefícios para a saúde humana e animal.

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O uso de alimentos funcionais na dieta humana e animal ficou em evidência após resultados de pesquisas que relataram a atividade benéfica relacionada com a ingestão de alguns micro-organismos na alimentação. O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, em 1984. O interesse por este tipo de alimentos deveu-se ao aumento da expectativa de vida de sua população, pois procurava formas de reduzir a incidência de doenças crônico-degenerativas e o custo representado por eles. Em seguida, foi proposto um programa de governo japonês que consistiu em promover pesquisas no campo das funcionalidades alimentares, a fim de desenvolver alimentos saudáveis com propriedades medicinais (MARTIROSYAN & SINGH, 2015, SHIMIZU, 2012).

O próprio termo "funcional", por si só, denota que o produto tem algum valor principal identificado para o benefício da saúde, e isso inclui reduzir os riscos de doenças para os consumidores. (STRINGHETA et al., 2007, MARTIROSYAN & SINGH, 2015). Na definição atual, os alimentos funcionais são alimentos naturais ou processados que contêm compostos bioativos que, em quantidades não tóxicas, promovem um benefício clinicamente comprovado para a saúde, prevenção, redução ou tratamento de doenças crônicas em humanos e animais (MARTIROSYAN & SINGH, 2015, RINGEL et al, 2015). Nesta medida, os probióticos podem ser considerados alimentos funcionais, mesmo porque proporcionam benefícios para a saúde além da função nutricional tradicional. Entre estes benefícios, destaca-se o melhor desempenho do intestino, a segurança contra a infecção, o estímulo da atividade imunológica, a grande capacidade de bloquear a invasão de potenciais agentes patogênicos no intestino, as propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas e até mesmo a redução dos distúrbios da obesidade (FIORINI et al., 1985; SPINOSA et al., 2000, OGGIONI et al, 1998, KABIR et al., 2004; LEFEVRE et al., 2015; AYALA et al, 2017).

Entre os probióticos compostos por bactérias, os bacilos recebem atenção especial (ELSHAGHABEE et al, 2017). Um dos primeiros probióticos utilizados como aditivo alimentar foi *Bacillus cereus*, mas muitos outros micro-organismos também são usados como alimentos funcionais, como os pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (COOK et al., 2012).

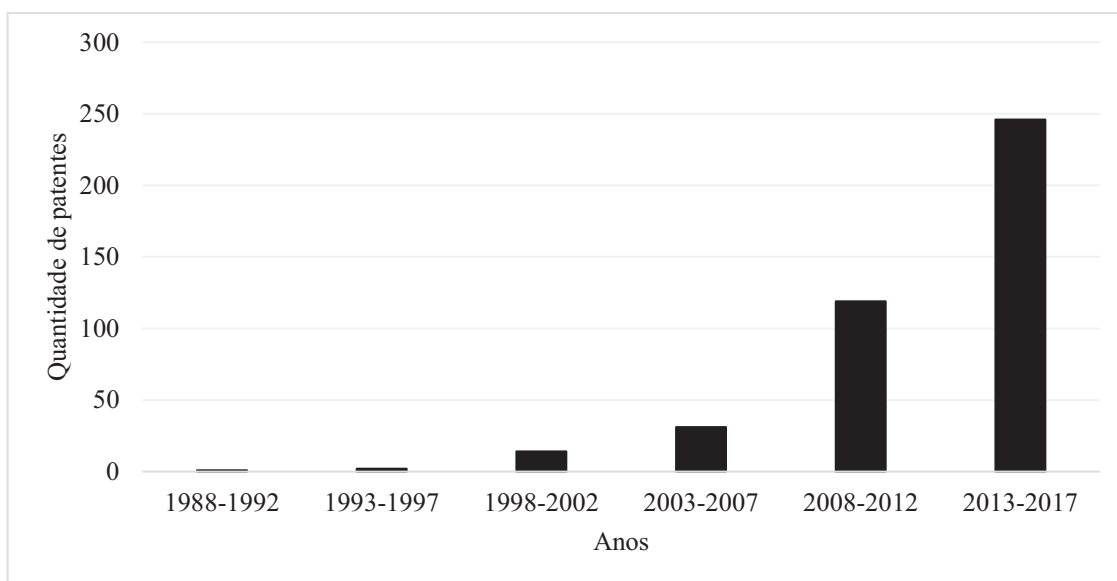
2.2 PROBIÓTICOS: HISTÓRICO, DEFINIÇÃO E CENÁRIO ATUAL

A ideia introduzida de probiose foi proposta em 1965, por Lilly & Stillwell, para designar substâncias desconhecidas produzidas por um protozoário ciliado que estimulava o crescimento de outro ciliado, porém este conceito inicial estava relacionado no âmbito ação deste produto. Em 1974, Parker definiu os probióticos como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal", incluindo, nesta perspectiva, a ação de ambos, os microrganismos e substâncias não vivas. Mais tarde, Fuller (1989) o definiu como "suplemento de alimentação microbiana viva que afeta benéficamente o animal hospedeiro e melhoram o equilíbrio microbiano intestinal". Assim, restringiu, na sua concepção, a definição aos microrganismos, excluindo, portanto, a palavra "substância".

Atualmente, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiram probióticos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde ao hospedeiro" (FAO / OMS, 2001, SAAD, 2006). Esta definição de probióticos é a mais amplamente aceita e adotada pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (HILL et al., 2014).

As comprovações robustas dos benefícios atribuídos aos produtos probióticos fizeram que sua pesquisa e seu mercado tivessem um crescimento proeminente nos últimos dez anos (FIGURA 3), conforme dados da Capes, DII (DERWENT INNOVATIONS INDEX) e Web os Science (ISI WEB OF KNOWLEDGE).

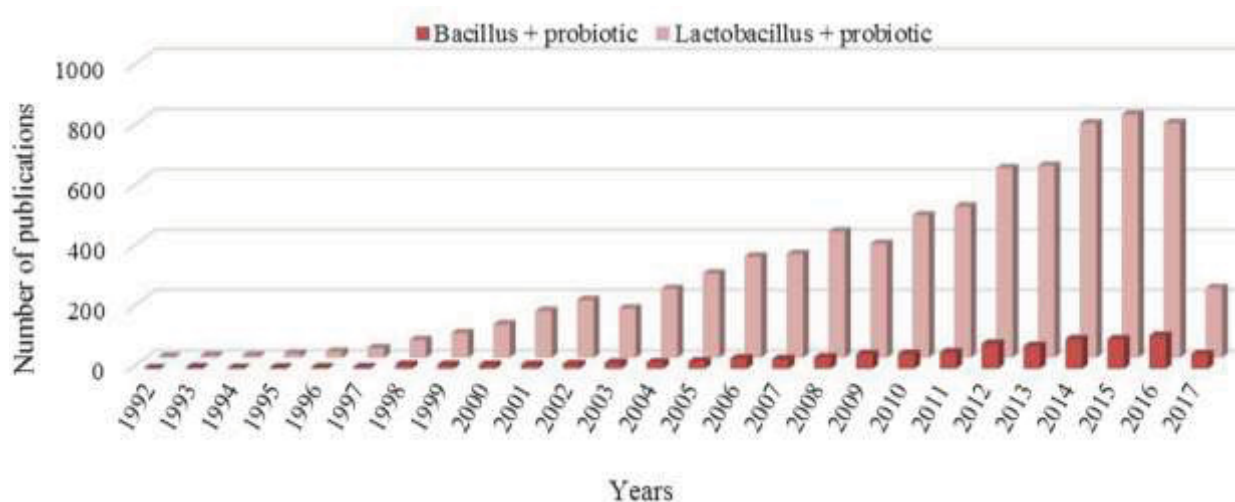
FIGURA 3 - PATENTES DE PROBIÓTICOS REGISTRADAS NO MUNDO NO PERÍODO DE 1988 A 2017



FONTE: O AUTOR, A PARTIR DA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE, DERVENT INNOVATION INDEX (DII)

O aumento significativo das pesquisas e publicações relacionadas a probióticos estavam relacionadas majoritariamente ao gênero *Lactobacillus* (FIGURA 4), porém nos últimos cinco anos, o gênero *Bacillus* tem recebido crescente atenção devido às suas características de resistência e termoestabilidade (ELSHAGHABEE et al, 2017).

FIGURA 4 - PUBLICAÇÕES REFERENTES ÀS PALAVRAS CHAVES “*Bacillus*+ PROBIOTIC” AND “*Lactobacillus* + PROBIOTIC” DE 1992 a 2017 (parcial).



FONTE: ELSHAGHABEE et al., (2017)

Os probióticos são produtos inovadores, naturais, que atuam como ponto principal na restauração da flora intestinal, sendo desta forma, melhoradores da saúde humana e animal. Em animais aumentam o aproveitamento das proteínas, aminoácidos e energia da dieta. Particularmente, em aves, melhoram a atividade da fitase bacteriana; reduzem a mortalidade embrionária; aumentam a produção de ovos e o número de ovos férteis. Adicionalmente, reduzem o aparecimento de neoplasias melhorando a atividade imunológica (FLEMMING & FREITAS, 2005, TRIPATHI & GIRI, 2014).

Estudos mais recentes têm enfatizado análises no uso de modelos animais, da microbiota intestinal e da metagenômica para examinar a associação entre a dieta e a composição e função da microbioma intestinal. Comprovadamente, os efeitos das dietas associadas ao uso de probióticos resultam em mudanças nos padrões de reações bioquímicas no lúmen intestinal (HEMARAJATA & VERSALOVIC, 2013). Estes efeitos também podem ser mensurados em benefícios como: regeneração da flora, a reabsorção de água, o auxílio na formação do bolo fecal e estimulante da proliferação das bifidobactérias, bactérias reconhecidas como adjuntos dietéticos com propriedades probióticas.

Para a atividade probiótica, as células bacterianas devem atingir o intestino na sua forma viável. Se um produto contém bactérias probióticas, e esses microrganismos estão inviáveis ou em pequenas quantidades, mesmo assim podem conferir benefícios ao hospedeiro, mas não será possível certificar a probiose (SANDERS et al., 2007; FALLAH & MIRZAEI, 2016). Os micro-organismos devem ser resistentes, sua estrutura deve ser capaz de tolerar condições físicas e químicas extremas, como o pH ácido do trato gastrointestinal. Desta forma, o uso de bactérias microencapsuladas e formadoras de esporos é comum, para fornecer à indústria um produto com características robustas, como "longos períodos de vida útil" e resistência a condições adversas (SHEWALE et al, 2014). As espécies mais utilizadas em produtos microencapsulados são *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, enquanto em forma esporulada o uso de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus coagulans*.

2.3 O PAPEL DOS ALIMENTOS PROBIÓTICOS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

A palavra probiótico, por si só, já é definida como "para a vida", isto é, em favor da vida. De fato, a definição internacional atualmente aceita é que os probióticos são micro-organismos vivos, que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FULLER, 1989; SAAD, 2006; MAKINEN et al., 2012; FAO / OMS, 2001).

A probiose também pode ser medida em benefícios como: regeneração de flora, reabsorção de água, ajuda na formação de bolo fecal e estimulante da proliferação de bifidobactérias, bactérias reconhecidas como adições dietéticas com propriedades probióticas. Além disso, a microflora intestinal no seu melhor funcionamento aumenta a imunidade e também impede a adesão dos micro-organismos patogênicos pela ocupação de locais de ligação (MARTINS et al., 2005; HENKER et al., 2007; PANT et al., 2007; KOZASA, 1989). Quando introduzidos na dieta animal, os probióticos demonstraram melhorar o desempenho dos frangos de corte, auxiliar no controle da diarreia em leitões, inibir o crescimento indesejável de microrganismos, como *Salmonellas* e diminuir a mortalidade perinatal em animais (JUNQUEIRA et al., 2007)

No caso de animais confinados, a alimentação tradicional baseada em forragens verdes é, portanto, substituída por uma ração composta de farinha de grãos. No rúmen animal, os microrganismos presentes no seu interior utilizam rapidamente os carboidratos e proteínas para seu crescimento e multiplicação, desta forma, a microbiota ruminal produz alguns metabólitos desta fermentação, tais como: ácidos graxos de cadeia curta (antigamente conhecidos como ácidos graxos voláteis) e proteína microbiana, sendo, assim, as principais fontes, respectivamente, de energia e proteína para o animal. Desta forma, a ação probiótica é dada pela ação das bactérias que facilitam o processo de digestão dos grãos e, conseqüentemente, reduzem as doenças metabólicas. A incidência de doenças também pode ser acentuada no ambiente limitado de confinamento, onde os animais se fecham juntos, o que facilita a disseminação pelo meio ambiente. Portanto, além da melhora da digestibilidade e da prevenção dos distúrbios gástricos, o papel dos probióticos também está relacionado à inibição de microrganismos ruins, de modo que o animal permaneça saudável, tornando o uso destes produtos interessantes ao pecuarista, com resultados demonstrados de melhoria nos índices zootécnicos e

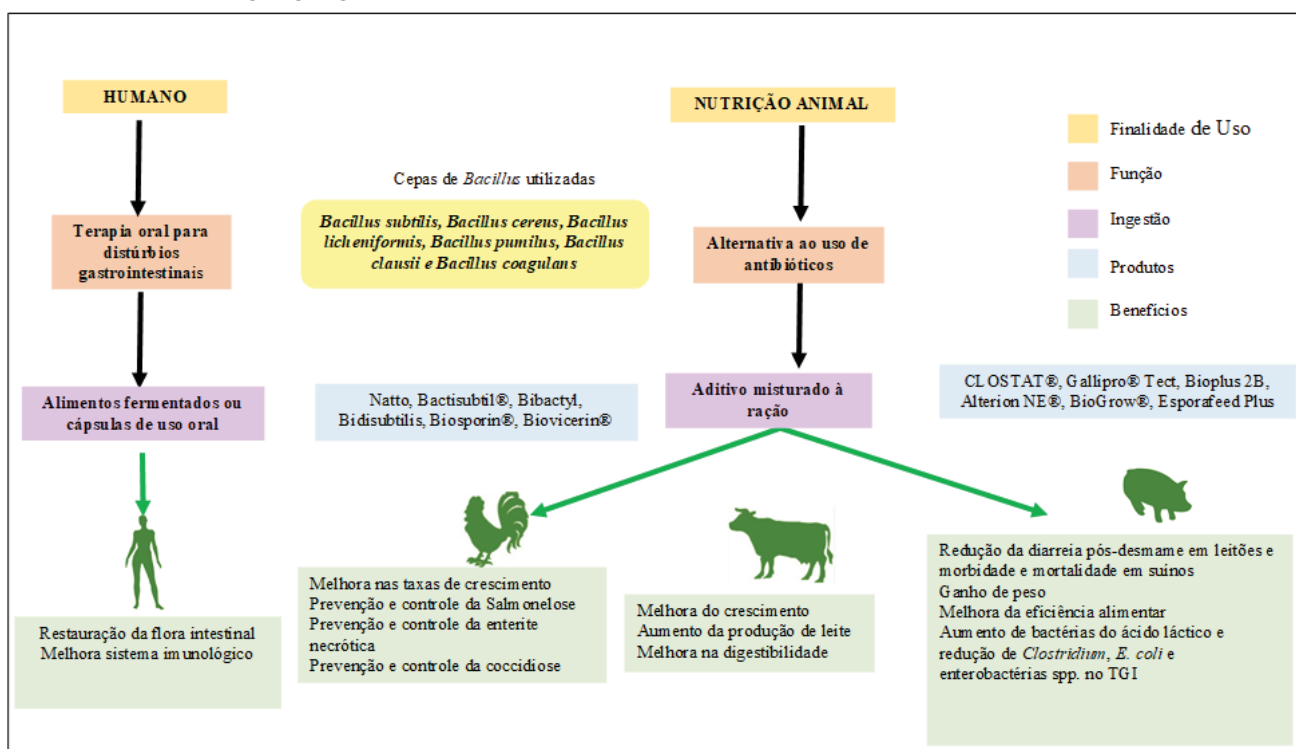
financeiros, os quais são importantes para serem considerados como ferramentas na produção animal. (BEAUCHEMIN et al, 2007; WALLACE, 1994; UYENO et al., 2015)

Na saúde humana, ainda que o papel primário da dieta seja fornecer os nutrientes essenciais para as necessidades metabólicas, recentes pesquisas enfatizam os probióticos como promotores de saúde, agindo como moduladores de várias funções no organismo (SIDHU et al, 2017). Mais especificamente, os benefícios do consumo de probióticos observados em humanos são mensurados em inúmeras áreas de ação como:

- Apresentar atividade antioxidante (WANG et al, 2017);
- Melhorar o tratamento de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal, como diarreia e constipação (OKSANEN et al 1990; WANITSCHKE et al, 2003; WANG et al, 2017; SHARIF et al, 2017);
- Competir por sítios de ligação com os organismos patogênicos, reduzindo a população patogênica e mantendo o balanço microbiano adequado (KAILASAPATHY, CHIN, 2000);
- Produzir de ácidos orgânicos graxos de cadeia curta, que após absorvidos contribuem para disponibilizar energia acumulada no hospedeiro, protegendo contra alterações patológicas na mucosa (NEWBOLD, 1996; AROWOLO, 2018; CORCIONIVOSCHI et al., 2010);
- Melhorar a imunidade, aumentando a resposta imune específicas e as não-específicas (PESTKA, 1993), diminuindo a incidência de doenças e promovendo uma redução no uso de antibióticos. A atividade imunoestimuladora é mediada por meio da ativação dos macrófagos, aumento dos níveis de citocinas, aumento da atividade das células natural killer e/ou aumento dos níveis de imunoglobulinas (SANDERS, 1999);
- Aliviar os sintomas da intolerância a lactose (MARTEAU & RAMBAUD, 1993; SALMINEN et al, 1996) e auxiliar na redução dos níveis de colesterol LDL (AGERHOLM-LARSEN et al, 2000);
- Neutralizar os efeitos mutagênicos e genotóxicos, e consequente relacionada à redução dos riscos de câncer (GOLDIN et al, 1996; TEITELBAUM & WALKER, 2002).

A Figura 5 contém informações as principais ações probióticas das bactérias do gênero *Bacillus* em humanos, aves, bovinos e suínos.

FIGURA 5 - UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ESPORULADAS DE *Bacillus* COM FINALIDADE PROBIÓTICA



FONTE: O AUTOR (2018)

2.4 USO DE ESPOROS DO GÊNERO *Bacillus* COMO PROBIÓTICO

Conforme citado por Sella et al. (2015), o gênero *Bacillus* foi estabelecido por Ferdinand Cohn em 1872 e mais tarde, no mesmo ano, por Koch, embora Christian Gottfried Ehrenberg seja frequentemente creditado com a primeira descrição publicada de *Bacillus subtilis* em 1835 (RASMUSSEN, 2009; HARWOOD, 1989). Inicialmente, a classificação do gênero baseava-se na capacidade de esporular e caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica. Atualmente, os 16 rRNA e os espaçadores transcritos internamente 16S-23S são analisados para filogeneticamente agrupar o gênero *Bacillus* em subclusters (XU & CÔTÉ, 2003). O gênero *Bacillus* inclui bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos, que podem usar vários substratos nutricionais. (HOFFMANN & PHARM 2005). A morfologia e tamanho da colônia são características altamente variáveis, dependendo das condições ambientais. A maioria das espécies são generalizadas na natureza e formam endósporos resistentes. Estes endósporos são estruturas adormecidas, não reprodutivas, que podem sobreviver sem nutrientes e resistem a agentes físicos e químicos extremos (HUANG et al., 2008).

É relatado que as espécies de *Bacillus* foram utilizadas como probióticos há pelo menos 50 anos com o produto italiano conhecido como Enterogermina registrado em

1958 na Itália como um suplemento medicinal OTC. No entanto, o maior interesse no desenvolvimento de tecnologias para a produção de drogas e alimentos ocorreu nos últimos quinze anos, em que o uso generalizado de cepas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis* (HONG et al., 2005; MAZZA, 1994; SANDERS et al, 2003).

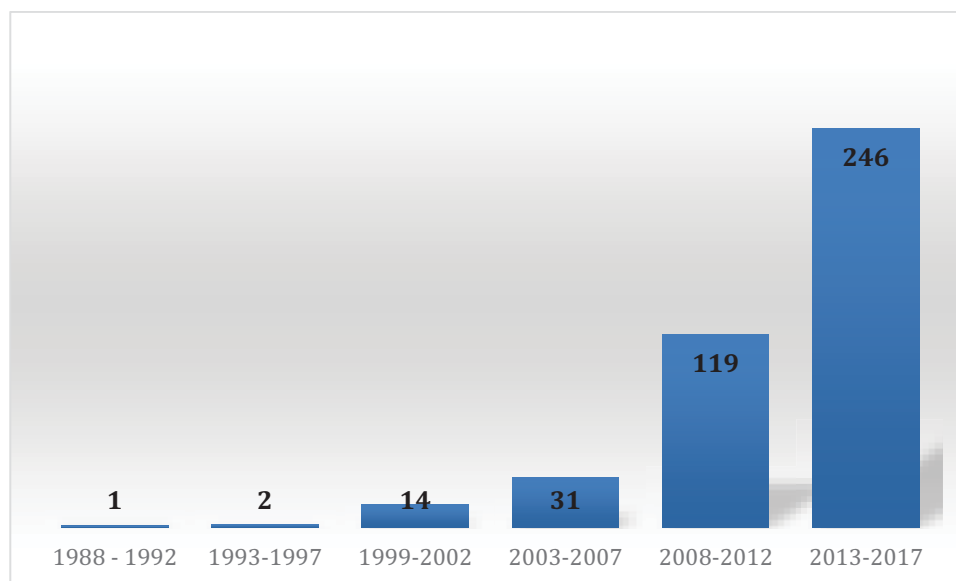
Também é amplamente documentado que as formas desses esporos bacterianos estão sendo usadas como suplementos probióticos para uso em alimentos para animais, para consumo humano e em medicamentos. A importância destes estudos tem crescido consideravelmente, uma vez que é necessário obter produtos biotecnológicos quimicamente resistentes e termodinamicamente estáveis e, desta forma, sobreviver à barreira gástrica, tornando-se assim produtos atraentes no ramo de aditivos alimentares. (CUTTING, 2011). Destaca-se ainda, o conhecimento e o estudo da importância das características principais dessas bactérias, bem como suas aplicações dentro da indústria de biotecnologia, a fim de gerar produtos ou serviços que possam cooperar com a qualidade da alimentação, com a produção agrícola e animal, com a saúde humana e com outros segmentos de produções e outras cadeias de valor industrial, que empregam essas novas descobertas para melhoria de processos de produção.

De acordo com Olmos & Paniagua-Michel (2014) *B. subtilis* pode ser considerado como uma bactéria probiótica multifuncional perfeita para humanos e animais devido à sua versatilidade de utilização de nutrientes de crescimento, alto nível de produção de enzimas, secreção de compostos antimicrobianos, produção de esporos. Adicionalmente o cultivo deste microrganismo não é complexo, sendo também considerado seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

A utilização de esporos de *Bacillus* sp. tem recebido a atenção de muitos pesquisadores das áreas de alimentos e na agroindústria. Existe um grande interesse em maximizar a produção destes microrganismos na forma esporulada, devido às características de resistência aos fatores químicos e físicos que preservam o produto, fazendo com que possa chegar ao intestino em quantidades suficientes para desenvolver os mecanismos de probiose.

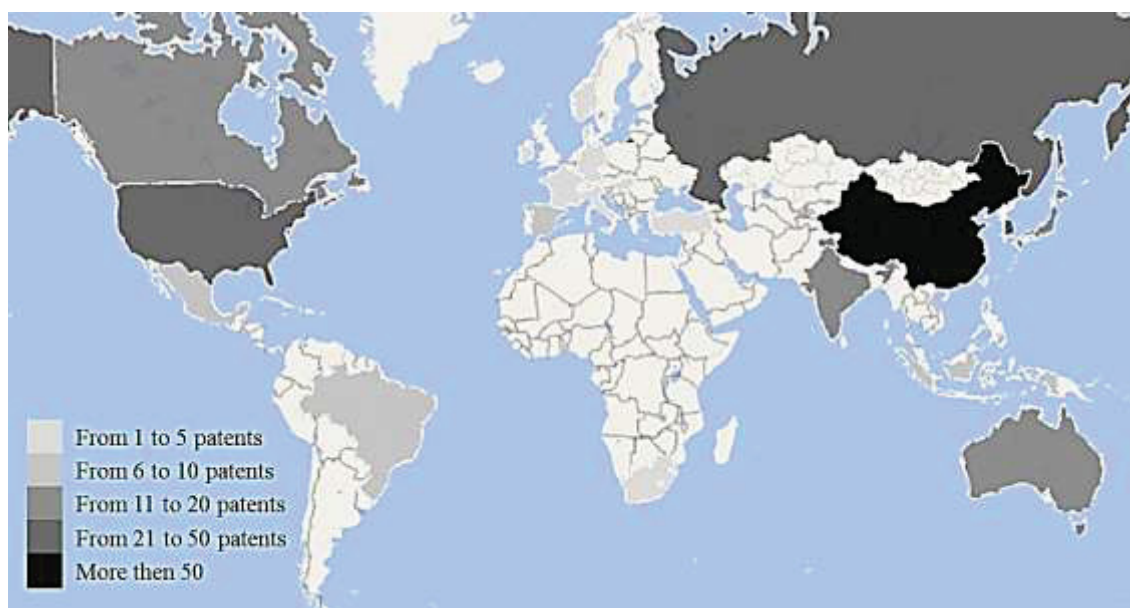
A rápida expansão do uso de espécies de *Bacillus* como alimento funcional probiótico e o desenvolvimento de novos produtos é corroborada pelo número de patentes desenvolvidas, principalmente nos últimos anos como demonstrado nas Figuras 6 e 7.

FIGURA 6 - PATENTES DEPOSITADAS NO PERÍODO DE 1988 A 2017 REFERENTES AO PROBIÓTICOS DO GÊNERO *Bacillus*.



FONTE: O AUTOR (2018), A PARTIR DA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE, DERVENT INNOVATION INDEX (DII).

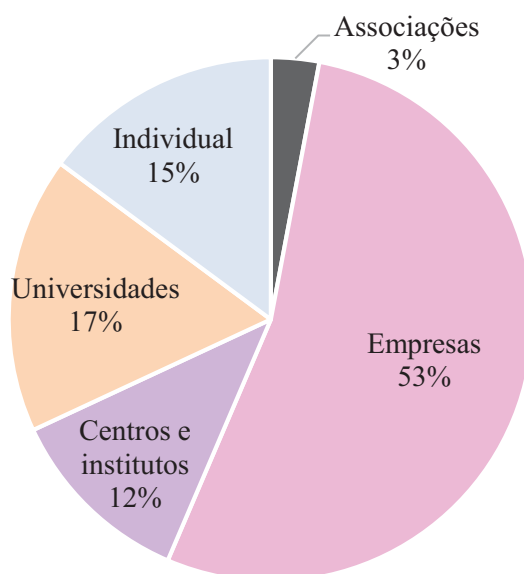
FIGURA 7 - PATENTES REFERENTES A PROBIÓTICOS COM O GÊNERO *Bacillus* REGISTRADAS NO MUNDO, POR PAÍS, DE 1988 A 2013.



FONTE: O AUTOR (2018), A PARTIR DA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE, DERVENT INNOVATION INDEX (DII).

A maior representatividade das patentes depositadas é de autoria de empresas (Erro! Fonte de referência não encontrada. 8), o que demonstra o grande impacto e perspectivas de crescimento comercial dos produtos probióticos com formulação a base de *Bacillus sp.*

FIGURA 8 - AUTORIA DAS PATENTES DE PRODUTOS PROBIÓTICOS COM FORMULAÇÃO A BASE DE *Bacillus sp.* DEPOSITADAS NO MUNDO NO PERÍODO DE 1988 A 2013.



FONTE: O AUTOR (2018), A PARTIR DA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE, DERVENT INNOVATION INDEX (DII).

2.5 EFEITOS PROBIÓTICOS ASSOCIADOS À INGESTÃO DE *Bacillus subtilis*

Uma das principais bactérias formadoras de esporos usadas como probiótico na alimentação animal é o *Bacillus subtilis*. Este microrganismo, também conhecido como bacilo do solo, não patogênico para animais, capaz de formar esporos e de natureza transitória no trato gastrointestinal, (CUTTING, 2011). No entanto, a aptidão em colonizar o intestino delgado e atuar como um micro-organismo comensal foi relatada por Hong et al. (2009), em um estudo de isolamento, identificação e caracterização de cepas de *Bacillus subtilis* a partir de biópsias de tecidos de intestino humano de voluntários.

Em termos fisiológicos, a capacidade em formar esporos em ambientes aeróbicos e anóxicos, faz com que este microrganismo seja uma alternativa promissora dentro do campo probiótico, principalmente considerando que durante muitos anos, a

maior parte das pesquisas no campo probiótico foi dirigida aos estudos com lactobacilos (ELSHAGHABEE, 2017).

Estudos que usaram esporos de *Bacillus subtilis* mostraram que a melhora da resposta imune humoral e celular pode ser induzida tanto por esporos vivos quanto por esporos inativados (HUANG et al., 2008; OLIVEIRA-NASCIMENTO et al., 2012).

Leandro et al. (2010) avaliaram a digestibilidade do probiótico (*Bacillus subtilis*) não observando melhora no desempenho ou na digestibilidade dos nutrientes da ração quando os frangos foram ou não submetidos a desafio microbiológico com *Salmonella enteritidis*. Porém, quando as aves receberam o probiótico somente após o alojamento das aves (pós-eclosão), os resultados de redução da salmonela no trato gastrintestinal dos pintainhos (após 21 dias de idade) mostraram que a população de bactérias benéficas do probiótico precisou de um tempo para sua colonização intestinal. No entanto, quando administrado no ovo antes das aves serem submetidas ao desafio por *salmonella* (logo após a eclosão), o probiótico foi capaz de proporcionar aos pintainhos desafiados melhor desempenho e redução na colonização do trato gastrointestinal por *salmonellas*, corroborando os resultados que também descritos por Ziprin et al. (1993).

O estudo realizado por Appelt et al. (2010) verificou o efeito do probiótico composto por *Bacillus subtilis* em diferentes níveis de ração (origem vegetal e animal). Fatores como o ganho de peso, a conversão alimentar e a mortalidade na fase de 1 a 21 dias de idade foram avaliados e neste caso não houve efeito do probiótico sobre o desempenho das aves.

Em um estudo comparativo realizado por Flemming & Freitas (2005), foram avaliados os efeitos da suplementação dos aditivos: probiótico isolado (cepas de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* $3,2 \times 10^9$ UFC/kg de produto); probiótico mais mananoligossacarídeos (0,5 MOS/ton. de ração), promotor de crescimento (Avilamicina 10g/ton. de ração) e ausência de aditivos no desempenho de frangos de corte. No período avaliado de 22 a 28 dias, a suplementação probiótica e o promotor de crescimento conferiram um melhor ganho de peso comparado ao grupo controle, não diferindo entre a associação de probióticos e prebióticos. Ainda neste estudo é reportado que a associação probiótico mais prebiótico promoveu um menor consumo de ração que o grupo controle e probiótico; porém, não diferiram das dietas que continham o promotor de crescimento.

Corrêa et al. (2003) realizaram um estudo comparativo do efeito do probiótico (*Bacillus subtilis* 1×10^{12} UFC/kg de produto), e o probiótico composto de várias cepas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarium*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi*, *Sacharomices cerevisiae* em $2,5 \times 10^{11}$ UFC/kg de produto) com a bacitracina de zinco (0,013%) como promotor de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte analisados na fase de crescimento e terminação. Neste estudo, os parâmetros de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar não foram afetados pelo uso de antibiótico ou probióticos na ração.

A variabilidade nos efeitos observados pode ser oriunda da quantidade de aditivo adicionada à ração. O fator quantidade de aditivo/quantidade de ração deve fornecer uma quantidade mínima necessária de células finais que possam germinar no intestino, formar as barreiras contra patógenos, e secretar os compostos antimicrobianos.

As informações referentes aos benefícios observados, comparados à dosagem de final probiótico na alimentação estão contidas no Quadro 1.

QUADRO 1 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO E DOSE DE USO EM AVES DE PROBIÓTICOS CONTENDO *Bacillus* sp.

MICRO-ORGANISMO	CONC. TESTADA/USO	RESULTADOS	REFERENCIA
<i>B. subtilis</i> 10 ⁸ UFC/kg	10 ⁵ UFC/g	Frangos: aumento de ganho de peso	ZHANG, Z. F et al., 2013.
<i>B. subtilis</i> 10 ⁹ UFC/g	1,5 a 6,0. 10 ⁵ UFC/g	Não apresentou mudanças significativas para peso vivo, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade.	DOMINGUES et al., 2014
<i>B. subtilis</i>	10 ⁵ UFC/g	Melhora no desempenho de crescimento de frangos de corte e reduz as emissões de NH3 e H2S.	ZHANG et al, 2013.
<i>B. subtilis</i> (<i>GalliPro</i>) 4,0 x 10 ⁹ UFC/g		Frango - O efeito sobre o peso corporal (BW) não foi significativo. - Não tiveram efeito significativo sobre a ingestão alimentar média diária. A taxa de conversão alimentar dos pintos foi 2,7% superior O efeito dos tratamentos sobre as características das carcaças não foi significativo. O GalliPro® liberou, no teste de digestibilidade, 0,4% de proteína bruta da dieta, opção consequentemente diminuiu o custo de alimentação de frangos de corte.	ZAGHARI et al. 2015
<i>B. subtilis</i> 3,2 x 10 ¹⁰ UFC/g <i>B. licheniformis</i>	1,3 .10 ⁶ UFC/g 6,5. 10 ⁸ UFC/L água	Suínos e perus Reduzir a mortalidade de leitões quando utilizados durante um ciclo reprodutivo completo de porcas. Resultados inconclusivos para engorda de perus	BioPlus 2B (EFSA Journal 2007)
<i>B. subtilis</i> 1,0 x10 ⁹ UFC/g	6,7 . 10 ⁵ UFC/g	<i>Bacillus subtilis</i> C-1302 é capaz de proporcionar um efeito probiótico que conduz a um melhor desempenho de crescimento e eficiência alimentar, devido à manipulação da microflora intestinal, com efeitos colaterais mínimos em frangos de corte.	JEONG & KIM, 2014
<i>B. subtilis</i>	3,5 . 10 ⁵ a 4,0 . 10 ⁹ UFC/g	A adição do probiótico nas dietas de frangos de corte em condições de desafio sanitário é eficiente na melhora dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta.	LUEGAS et al., 2015
<i>Bacillus subtilis</i> 1,0 x10 ¹¹ UFC/g <i>B. laterosporus</i> .	1,0 . 10 ⁶ UFC/g	PERU- (17,5%) - de redução em número de <i>Salmonella</i> recuperada - não houve diferença significativa na taxa de colonização; não teve um impacto significativo sobre o número de coliformes ou bactérias lácticas no ceco. - Teve um impacto significativo (positivo) no peso corporal	WOLFENDEN et al., 2011

FONTE: O AUTOR (2018).

A forma com que é conduzido o estudo experimental pode afetar os resultados observados. No caso de testes com desafios com *Salmonellas*, por exemplo, deve-se estudar o tempo necessário à adaptação intestinal e desenvolvimento do mecanismo de probiose. Se o estudo adicionar a *Salmonella* de forma concomitante a adição do esporo do bacilo, muitas vezes, o micro-organismo não terá tempo de germinar, formar a barreira nas vilosidades e secretar produtos antimicrobianos de seu metabolismo, gerando a ideia de que a probiose não foi exercida. No entanto, se a função do probiótico é atuar na prevenção e fortalecer o organismo antes da contaminação, estudos podem ser conduzidos também para avaliar o tempo de desenvolvimento dos parâmetros probióticos, para então receber o desafio com patógenos.

Desta forma, os prováveis mecanismos de ação dos probióticos, consistem na melhora da digestibilidade e, conseqüentemente, na melhora do ganho de peso de frangos de corte, sendo caracterizados pela redução do pH (resultante da produção de ácidos orgânicos) e no crescimento e desenvolvimento diferenciado das bactérias benéficas que criam um ambiente de exclusão competitiva (BERTECHINI e HOSAIN, 1993).

O Quadro 2 e o Quadro 3 contêm as informações sobre os principais benefícios da ingestão de probióticos compostos de *Bacillus subtilis* em humanos e em frangos de corte respectivamente.

QUADRO 2 - PRINCIPAIS BENEFÍCIOS DA INGESTÃO DE PROBIÓTICOS DE *Bacillus subtilis*

BENEFÍCIOS OBSERVADOS	REFERÊNCIAS
Possui atividades antioxidantes Proteção do DNA Proteção das células intestinais contra lesões nos tecidos:	PRAZDNOVA, et al., 2015 ELSHAGHABEE et al., 2017 SUN, et al., 2018
Diminuição da obesidade	LEI, et al., 2015
Benéfico contra diabetes	JOSEPH, et al., 2013
Equilíbrio da microbiota do intestinal	HOA, et al., 2001 TANG, et al., 2016 GAO et al, 2017
Redução de transtornos intestinais como constipação e diarreia.	LIU, et al., 2012 HOROSHEVA, et al., 2014
Eficaz contra a síndrome do intestino irritável	TOMPKINS, et al., 2010.
Melhora da resposta imunológica	APS, et al., 2015
Combate infecções	LEFEVRE, et al., 2015 TAM et al., 2006 VUKOVIĆ, et al., 2001
Propriedades anticarcinogênicas	WANG, et al., 2007 ABDEL-FATTAH, et al., 2012 KIM, et al., 2007

Fonte: O AUTOR (2018).

QUADRO 3 - EFEITOS DA INGESTÃO DE *Bacillus subtilis* EM FRANGOS DE CORTE

BENEFÍCIOS OBSERVADOS	REFERÊNCIAS
(Melhora na digestão e absorção de nutrientes atuando na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares);	QIN, et al., 2018
Produção de nutrientes para a célula da mucosa intestinal	KURITZA, et al., 2014
Redução das taxas de amoníaco e auxílio na eliminação de aminas biogênicas tóxicas;	ZHANG, et al., 2013
Ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas que agem inibindo o crescimento de outras bactérias);	KHOCHAMIT, et al., 2015
Produção de lactato e acetato e consequente redução do pH do meio, exercendo efeito antibacteriano;	PRYDE, et al., 2002
Produção de metabólicos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas;	POORMONTASERI, et al., 2017
Produção de vitaminas do grupo B;	CHISTYAKOV, et al., 2015
Estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos;	GUO, et al., 2017
Restauração do equilíbrio da microbiota intestinal após antibioticoterapia	WU, et al., 2018
Ativação do sistema imune contra células malignas;	KRAŠKO, et al., 2018 TAKEDA, et al., 2016
Aumentos dos níveis aumenta ACP (Fosfatase ácida), LDH (lactato desidrogenase), NO (Óxido nítrico) e (Oxido sintase nítrica) Inos	HUANG, et al., 2013.
Diminuição da atividade da transaminase glutâmica oxalacética (GOT) e da transaminase glutâmica pirúvica (GPT)	LEI, et al., 2015.
Diminuição das taxas de glutatona redutase (GR), a xantina oxidase (XO), a proteína de choque térmico 90 (Hsp90) e o gene de síntese de lipídios 3β-hidroxiesteróide-red24 redutase (DHCR24).	LEI, et al., 2015.

Fonte: O AUTOR (2018).

2.6 MERCADO DE PROBIÓTICOS

De acordo com a Global Industry Analysts Research, uma consultoria de pesquisa de mercado dos EUA, a previsão é que a partir de 2018, o mercado de probióticos cresça a uma taxa de 6,8% ao ano em todo o mundo, impulsionado pelo fato de eles se adequarem como substitutos de antibióticos (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2018).

Na pecuária, o uso de produtos microbianos vivos para aplicações de alimentos para animais se intensificou na última década e hoje representa um setor de indústria de fermentação que está se expandindo rapidamente. O uso destes aditivos aumentou, uma vez que os probióticos aumentam a produtividade pecuária, devido à ação de micro-organismos que melhoram a digestão, combatem doenças e reduzem os custos nutricionais.

Os avanços na área de biotecnologia geram uma enorme oportunidade de novas pesquisas e desenvolvimento de novos probióticos para uso humano e animal. Fato corroborado por empresas multinacionais e nacionais de produção veterinária que atuam no País, como DSM Tortuga, Bayer, Ouro Fino e Boehringer Ingelheim. Estas corporações têm promovido uma corrida na produção de produtos sem antibióticos nos últimos anos. A americana Alltech e a brasileira Yes (adquirida pelo fundo de investimento argentino Aqua Capital em 2013), atuam exclusivamente nessa linha de produtos, atendendo empresas como a maior produtora de aves caipiras do Brasil “Frango Caipira do Campo”, de Ivaiporã (PR, criada em 2001, empresa que abate 720 mil aves por ano (MELO, 2018).

Na Tabela 1, estão relacionados os probióticos já disponíveis no mercado nacional e internacional e suas principais características.

TABELA 1 - PROBIÓTICOS APLICADOS À AGROINDÚSTRIA DISPONÍVEIS NO MERCADO E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

PRODUTO	EMPRESA	PAÍS	CEPA	CONCENTRAÇÃO (UFC / g MASSA SECA)	DOSE DE USO	SETOR DE APLICAÇÃO
CLOSTAT®	Kemin	Estados Unidos	<i>B. subtilis</i>	$2,2 \times 10^8$	0,5 – 1,0 Kg/T	Avicultura e Suinocultura
Gallipro® Tect	Ouro fino & Hansen	Brasil e Dinamarca	<i>B. licheniformis</i>	$3,2 \times 10^9$	$1,6 \cdot 10^7$ UFC/g	Avicultura
Bioplus 2B	Hansen	Dinamarca	<i>B. licheniformis e B. subtilis</i>	$3,2 \times 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^6$ UFC/g	Avicultura e Suinocultura
Alterion NE®	Adisseo e Novozymes	França, China e Dinamarca	<i>B. subtilis</i>	$1,0 \times 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^5$ UFC/g	Avicultura
BioGrow®	Provita Eurotech	Reino Unido	<i>B. licheniformis e B. subtilis</i>	$1,6 \times 10^9$	NE*	Avicultura e Suinocultura
Esporafeed Plus	NOREL SA	Espanha	<i>B. cereus</i>	$1,0 \times 10^9$	NE	Suinocultura

*NE: não especificada

FONTE: O AUTOR (2018)

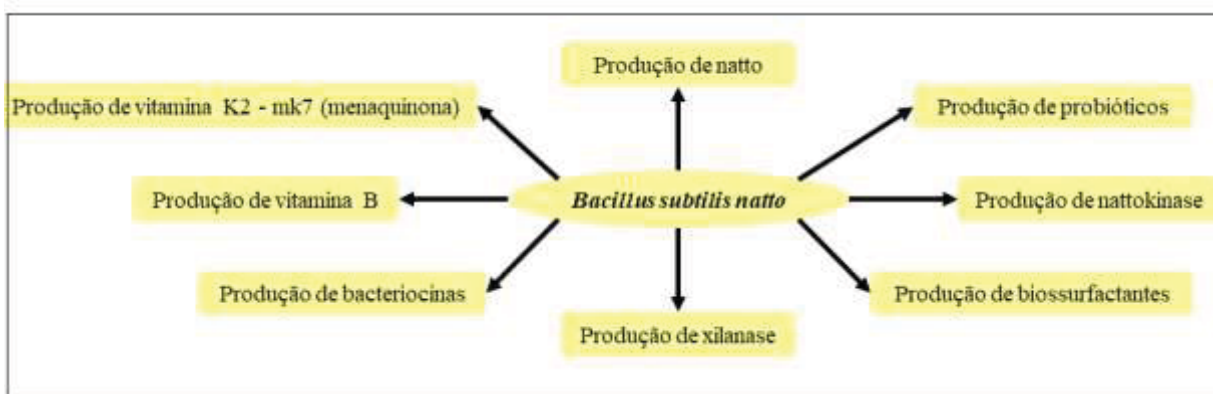
2.7 *Bacillus subtilis* var. *subtilis*

B. subtilis subsp. *subtilis* BEST195 (atual *Bacillus subtilis* var. (*subtilis*), foi cepa inicial usada para a produção de *natto* (alimentos fermentados de soja), acredita-se que tenha sido isolada há cerca de 100 anos. Foi caracterizada pela primeira vez pelo Dr. Sawamura em 1906 e recebendo a denominação de *Bacillus natto* Sawamura. Desde então, foi distribuído para grandes fabricantes comerciais (STEINKRAUS, 2004).

Esta cepa (FIGURA 10) tem sido estudada em inúmeras aplicações como a produção da vitamina K2 (menanoquinona), produção de vitamina B, produção de bacteriocinas, iturinas, biossurfactantes, produção de xilanases, formulação de probióticos. Notoriamente recebe destaque pela produção da enzima nattokinase e na alimentação humana com a produção do *natto* (YANAGISAWA et al., 2010) (CHEN et al., 2018), como apresentado na Figura 9.

A *subtilisina*, produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 é a bacteriocina mais amplamente estudada entre as produzidas por *Bacillus* classificada como lantibiótica, sua estrutura e mecanismo de ação são semelhantes aos da nisina, produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* (KLEIN & ENTIAN, 1994).

FIGURA 9 - APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO *Bacillus subtilis*



FONTE: O AUTOR (2018)

FIGURA 10 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO *Bacillus subtilis*

FONTE: JAPAN NATTOKINASE ASSOCIATION (2018)

A fermentação do *Bacillus subtilis* var. *subtilis*, no grão de soja, resulta num alimento conhecido como *natto*. O *natto* é de consumo tradicional na alimentação japonesa, obtido do processo fermentativo do bacilo, envolvido na palha de arroz seco, tanto é que a palha de arroz é o habitat natural das linhagens de *B. subtilis* formadoras de esporos. Embora esse alimento possua textura viscosa, é particularmente atrativo devido às suas propriedades funcionais. A soja fermentada possui 100 vezes mais vitamina K2 do que queijo, sendo esta vitamina, um componente chave na manutenção da densidade mineral óssea de mulheres pós-menopausa que sofrem de osteoporose. Além disso, possui atividade antimicrobiana e altos índices de manganês (que mantém a função da atividade da superóxido dismutase, um antioxidante muito importante que ajuda a controlar níveis de inflamação e estresse oxidativo do organismo) (KITAGAWA et al., 2017).

Por se tratar de um fermentado, o *natto* tem uma composição nutricional completamente diferente da soja em grão, especialmente a variedade geneticamente modificada. A soja não fermentada possui compostos indesejáveis, considerados antinutricionais como: goitrógenos (bloqueadores do hormônio tireoidiano que podem causar câncer e hipotireoidismo), fitoestrógenos (compostos que alteram a produção normal de estrogênio e podem estar relacionados ao câncer de mama); fitatos (causam cárie dentária); inibidores da tripsina (interrompem a digestão saudável e podem causar distúrbios pancreáticos); hemaglutinina (agentes de coagulação) (OETTERER, 2006; LIENER, 1981).

Por outro lado, a soja, após a ação fermentativa do *Bacillus subtilis*, constitui-se de um fermentado com características nutricionais peculiares (FIGURA 11 (a)). Dentre elas, é observado o fornecimento da enzima extracelular nattokinase. A história relata que

o pesquisador japonês, Dr. Hiroyuki Sumi, no ano de 1980, estava estudando o efeito fibrinolítico e após testar mais de 173 alimentos naturais, descobriu que o natto, quando inserido em uma placa de Petri contendo coágulos sanguíneos, apresentou efeito de dissolvê-los. Estudos comprovaram que a degradação do coágulo era devido à ação fibrinolítica da enzima nattokinase e pelo efeito de dissolução de coágulos, este alimento tem sido recomendado para tratamentos de doenças cardiovasculares (FIGURA 12). (WENG et al, 2017; CHEN et al, 2018).

FIGURA 11 – (A) *NATTO*: TRADICIONAL ALIMENTO JAPONÊS PRODUZIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SOJA POR *Bacillus subtilis* (B) *Bacillus subtilis* ISOLADO DO *NATTO*. (C) COLORAÇÃO DE GRAM DE CÉLULAS DE *Bacillus subtilis* (AUMENTO DE 1000 VEZES).



FONTE: WENG et al., (2017).

FIGURA 12 – AÇÃO DO *NATTO* E DA NATTOKINASE NA DISSOLUÇÃO DE FIBRINA (HALO SEMITRANSARENTE). (1-5) GRÃOS DE SOJA FERMENTADOS (*NATTO*); (6) CARACTERÍSTICA DO MATERIAL VISCOSO DE *NATTO*; (NK) NATTOKINASE COMERCIAL (100 µG) COMO CONTROLE POSITIVO; SOJA NÃO FERMENTADA E PBS (SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATO) COMO CONTROLES NEGATIVOS.



FONTE: WENG et al., (2017).

Outra característica peculiar é relacionada à produção ao PGA (*ácido γ -poliglutâmico*), que fornece uma textura adesiva ao *natto*. A estrutura genômica do *B. subtilis subsp. natto* é muito semelhante ao da cepa *B. subtilis subsp. subtilis 168*, embora o primeiro produza ativamente o PGA. O biopolímero PGA é produzido extracelularmente pelo *B. subtilis*, e solubilizado no meio de cultivo. É um elemento essencial para as bactérias que o produzem e possui diversas aplicações, dentre elas, a função de agente crioprotetor em bactérias probióticas (BHAT et al, 2013).

Considerando a produção extracelular do PGA e sua função crioprotetora, torna-se particularmente interessante a realização de estudos que relacionem a atribuição resistência dos esporos não só às mudanças fisiológicas dos estágios de esporulação, como a proteção crioprotetora secretada pela própria célula assegurando sua sobrevivência. A síntese de PGA ocorre em condições de estresse, e no *B. subtilis* é produzido como fonte de nutrientes em períodos de escassez (CHEN et al., 2005).

No entanto, a produção de PGA sozinha não é um precursor da capacidade de fermentar *natto*, já que muitas cepas positivas para PGA não podem ser usadas para a produção de *natto* (KUBO et al, 2011).

A cepa *B. subtilis subsp. natto* B-3666, está depositada no banco ARS Culture Collection (NRRL), sendo obtida pela empresa Hinode (Los Angeles, Califórnia), que a usou para produzir comercialmente o *natto* em 1969 (KUBO et al, 2011).

B. subtilis var. subtilis foi investigado também quanto a sua toxicidade, em estudo envolvendo a produção de γ -PGA. No respectivo estudo foi verificado que nenhum dos seis genes conhecidos por produzir toxinas (hbl D / A, nheB, bceT, entFM, sph, pipIc) estava presente em *B. subtilis var. subtilis* aferindo a segurança de seu uso.

B. subtilis subsp. natto demonstrou atividade probiótica quando testado em frangos de corte (SAMANYA & YAMAUCHI, 2002; ZHOU et al., 2015) e bezerros (SUN et al, 2010).

2.8 PROCESSO DE ESPORULAÇÃO

O *Bacillus subtilis* é um organismo modelo no estudo de esporulação bacteriana. O processo de esporulação é considerado mecanismo de defesa a condições ambientais desfavoráveis (falta de umidade, salinidade, pH extremos, radiação e exposição a solventes) que permitem a sobrevivência do micro-organismo à longo prazo em condições que causariam a lise de células na forma vegetativa (CUTTING, 2011).

A forma esporulada deste micro-organismo pode ocorrer em condições ambientais que dificultem o crescimento vegetativo, como escassez nutricional ou alta densidade celular. Estas condições, associadas a sinais internos relacionados ao metabolismo e ao ciclo celular, podem induzir o processo de formação do endósporo (LEVIN & GROSSMAN, 1998; REAL & HENRIQUES, 2001).

O processo de esporulação é uma resposta celular a condições desfavoráveis, no qual se desencadeiam uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas gerando uma estrutura robusta denominada esporo (TAN & RAMAMURTHI, 2014).

Estas estruturas são formadas durante a fase estacionária, em resposta a uma complexa rede de transdução de sinal, que integra uma variedade de características do meio e, pelo menos, dois fatores principais: a carência nutricional e alta densidade celular (DRIKS, 1999; MILLER e BASSLER, 2001; MCKENNEY et al., 2013). Com o aumento da biomassa, ocorre a elevação dos níveis de proteínas secretadas, as quais agem como autoindutores do *quorum sensing*. Quando estas moléculas sinalizadoras atingem níveis intracelulares elevados, ocorre a indução de uma extensa cascata de fosforilação e, consequentemente, o início da formação de um esporo ou processo de esporulação.

O processo de esporulação em *Bacillus subtilis* (FIGURA 13) é dividido em sete estágios, nos quais são também é observada uma sequência de mudanças morfológicas (KAY & WARREN, 1968; TAN & RAMAMURTHI, 2014):

- Estágio I. DUPLICAÇÃO DO DNA: Duplicação do material nuclear com formação do filamento axial, os cromossomos formam uma estrutura esticada ao longo da célula;
- Estágio II. FORMAÇÃO DO SEPTO: Separação da cromatina caracterizada pela divisão assimétrica: o pré-esporângio divide-se em duas partes: célula mãe e pré-esporo. Na

divisão, aproximadamente 30% do cromossomo fica no pré-esporo, o restante do DNA é translocado pela proteína SpoIIIE;

Estágio III. ENGOLFAMENTO: O pré-esporo é “fagocitado” pela célula-mãe e termina livre como um protoplasto dentro desta, envolvido por uma dupla membrana;

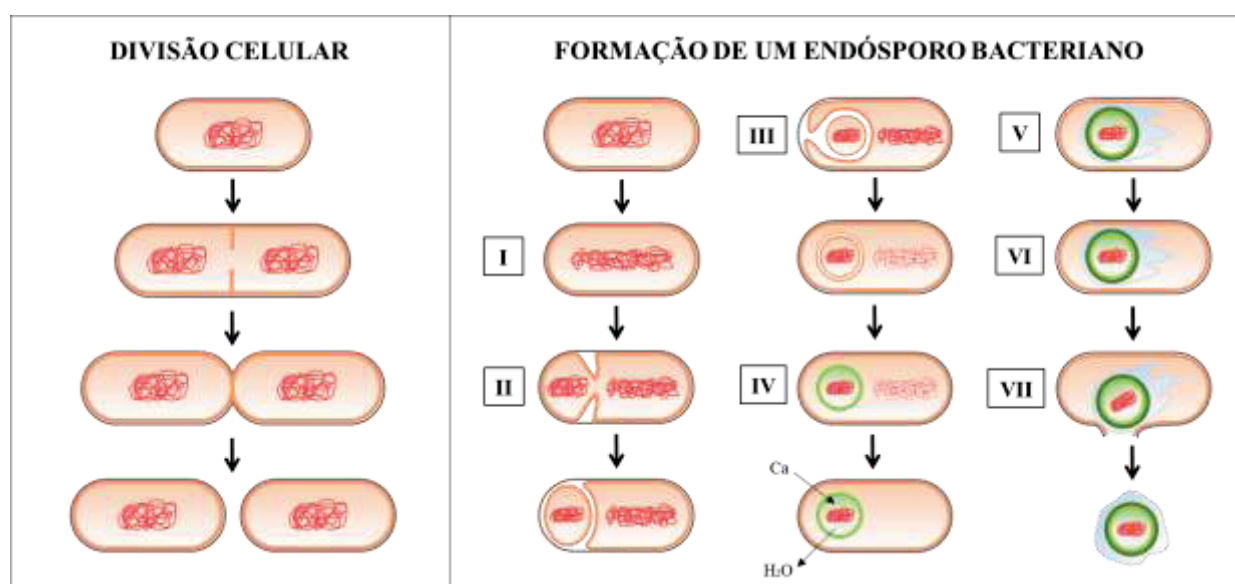
Estágio IV. FORMAÇÃO DO CÓRTEX: constituído por uma camada de peptídeoglicano entre duas membranas e acúmulo de ácido dipicolínico e cálcio no interior do esporo e perda d’água;

Estágio V. FORMAÇÃO DA CAPA: Síntese de membranas internas e externas, capa e exosporium que fornecem proteção ao esporo;

Estágio VI. MATURAÇÃO DO ESPORO: Quando o esporo adquire sua resistência máxima, entretanto, nenhuma mudança morfológica é detectada;

Estágio VII. LISE CELULAR: Liberação do esporo para o meio ambiente e autólise da célula vegetativa.

FIGURA 13 - PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR E FORMAÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS



FONTE: O AUTOR (2018)

2.9 ESTRUTURA DOS ESPOROS DE *B. subtilis*

A estrutura do esporo é resistente, diferentemente da célula-mãe que lhe deu origem, o que tipifica que a célula sofreu um processo de diferenciação celular (RIESENMAN & NICHOLSON, 2000).

Os esporos de *Bacillus* são constituídos por um complexo enzimático e químico, caracterizado numa formação de proteínas, glicoproteínas, peptidoglicanos e ácido

piridina-2,6-dicarboxílico. Esta estrutura possui uma quantidade reduzida de água comparada à célula vegetativa (o conteúdo de água diminui de 75-80%, nas células vegetativas, para 15-20%, na estrutura esporulada), consequentemente, com a redução da água, o metabolismo celular é reduzido, caracterizando a célula metabolicamente por um estado de dormência, que lhe confere uma estrutura resistente a condições desfavoráveis ao crescimento vegetativo, como ausência de nutrientes, baixa disponibilidade de água, ação de produtos químicos e extremos de temperatura e pH (DRIKS, 2004; PIGGOT & HILBERT, 2004).

Adicionalmente, a estrutura resistente permite a estocagem sem refrigeração por longos períodos e a preservação da viabilidade celular. Segundo Riesenman & Nicholson (2000), a estrutura de *B. subtilis* demonstrou que, além da resistência à lisozima (substâncias esporicidas) e ao H_2O_2 , o revestimento de esporos intacto contribui para a resistência dos esporos de *B. subtilis* à radiação UV-B artificial e à radiação solar UV-B e UV-A.

A estrutura do esporo confere também ótima tolerância às condições ácidas do estômago e sais biliares, fazendo com que a utilização desta bactéria na forma esporulada seja indicada na formulação de alimentos probióticos (CUTTING, 2011).

Uma das vantagens da utilização de esporos no estágio de dormência é a estrutura com múltiplas camadas, (ácido dipicolínico, DPA) e percentual reduzido de água, o que a torna mais resistente, principalmente a compostos químicos, calor, radiação por longo tempo. Adicionalmente, esta estrutura protege o esporo de compostos tóxicos de elevado peso molecular, possui microporos que permitem apenas a entrada de pequenos nutrientes, necessários para o início da germinação do esporo quando condições favoráveis estiverem presentes (DRIKS, 2002).

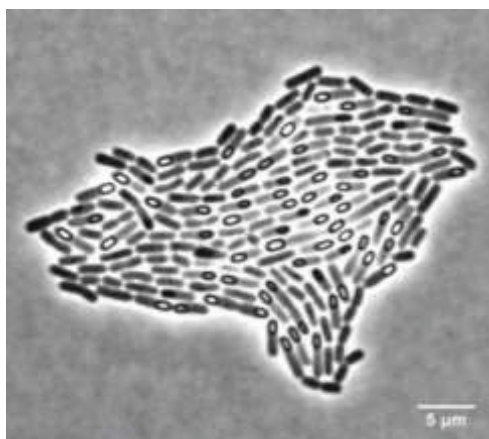
O esporo é uma estrutura robusta, com propriedades diferentes da célula vegetativa. Microscopicamente, são estruturas bem delineadas e brilhosas quando observadas em microscopia de contraste de fase - MCF (FIGURA 14), tratando-se de uma estrutura altamente resistentes a estresses tipicamente letais às células vegetativas (GIORNO et al., 2007).

FIGURA 14 – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DO ENDÓSPORO E DE *Bacillus subtilis* var. *natto* E SUA GERMINAÇÃO



FONTE: JAPAN NATTOKINASE ASSOCIATION (2018)

FIGURA 15-MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE DE CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO. CÉLULAS DE *Bacillus subtilis* EM ESTÁGIO AVANÇADO DE ESPORULAÇÃO EM QUE É POSSÍVEL VISUALIZAR OS ESPOROS COM O BRILHO CARACTERÍSTICO DENTRO DOS ESPORÂNGIOS.



FONTE: EIJLANDER et al., 2014.

Esporos são ainda dotados de propriedades de resistência a fatores que normalmente lisariam uma célula vegetativa como extremos de temperatura, radiação, agentes químicos e tempo (DRIKS, 1999; DRIKS, 2002). Essas propriedades são conferidas aos esporos graças às características de composição química e ultraestrutura.

A Tabela 2 contém um resumo das principais características que diferem a célula vegetativa do endósporo.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS ENTRE ENDÓSPOROS E CÉLULAS VEGETATIVAS

CARACTERÍSTICA	CÉLULA VEGETATIVA	ESPORO
Aspecto microscópico	Não refringente	Refringente
Teor de cálcio	Baixo	Elevado
Ácido dipicolínico	Ausente	Presente
Atividade enzimática	Elevada	Baixa
Captação de O ₂	Elevada	Baixa
Síntese de macromoléculas	Presente	Ausente
Resistência ao calor	Baixa	Elevada
Resistência a radiações	Baixa	Elevada
Resistência a agentes químicos	Baixa	Elevada

FONTE: MADIGAN (2016)

2.10 O USO DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS

Há muitos anos que o homem utiliza a fermentação sólida como ferramenta na obtenção de produtos. Bioquimicamente, pode-se afirmar que o regime de fermentação é um processo biológico bioquímico anaeróbico de obtenção de energia na forma de ATP, porém este termo pode apresentar uma definição diferente na literatura de estudo, sendo também indicado como “cultivo controlado de micro-organismos”, independente da presença ou não de oxigênio (MITCHELL et al., 2006).

Apesar de a fermentação submersa ser apresentada como um cultivo em fase líquida, em ambiente controlado, a literatura tem reportado que o regime de fermentação sólida pode propiciar maior rendimentos e redução de custos no âmbito industrial (OOSTRA et al., 2001).

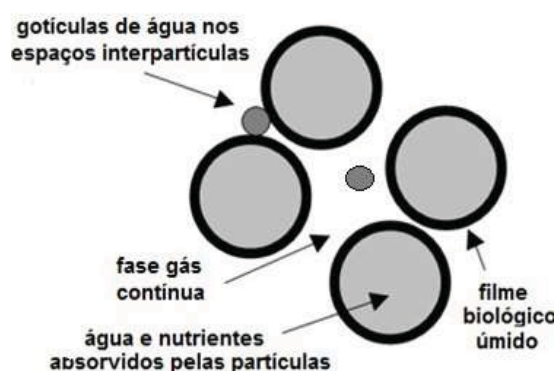
Recentemente, a demanda de consumo por alimentos saudáveis e as leis de biossegurança alimentar, aplicadas nacional e internacionalmente, têm repercutido em um aumento significativo do interesse na produção de probióticos. Apesar disso, ainda é escasso o que se reporta na literatura no que diz respeito ao processo de obtenção de esporos bacterianos no regime de fermentação sólida. A fermentação submersa possui um

espectro literário mais abrangente neste assunto. Além disso, durante muito tempo, a produção intelectual tem sido direcionada a reportar a utilização de cepas não formadoras de esporos, nas quais se buscava alternativas de melhorar a resistência por meio de métodos de encapsulamento.

No processo de fermentação em estado sólido, é tradicional o uso de subprodutos da agricultura e da indústria alimentícia que incluem: farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de maçã, bagaço de uva, bagaço de cana, bagaço da cana de açúcar, casca de soja, casca de banana, casca de frutas cítricas, palha de trigo, palha de arroz, polpas cítricas, melaços de cana e soja, dentre outros. (MITCHELL et al., 2006).

Processos de fermentação em estado sólido são caracterizados pela ausência de água livre, com umidificações do meio fermentativo que oscilam entre as faixas de 50 a 80%. O micro-organismo se desenvolve nas matrizes sólidas úmidas, em situações em que os espaços entre as partículas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água visível como pode ser visualizado na Figura 16, MITCHELL et al. (2006).

FIGURA 16- FATORES QUE DEFINEM OS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO-SÓLIDO (FES)



FONTE: ADAPTADO DE MITCHELL et al., 2006.

Resumidamente, as vantagens e desvantagens da fermentação sólida são descritas no Quadro 4.

QUADRO 4 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

VANTAGENS	REFERÊNCIAS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIAS
Pode ser aplicada a substratos insolúveis com possibilidade da utilização de resíduos e subprodutos abundantes.	(PANDEY, SOCCOL, MITCHELL, 2000)	Heterogeneidade do meio e os substratos podem não estar completamente acessíveis.	ZHANG, et al. 2014
A fermentação em si pode ser executada de forma muito simples	(PANDEY, SOCCOL, MITCHELL, 2000)	Implica em custos com mão de obra	
Promoção da viabilidade das cepas probióticas no regime de fermentação sólida favorecendo a produção de probióticos para uso animal	ZHANG, et al., 2014.	Dificuldade no controle das variáveis do processo	MITCHELL et al, 2006.
Possibilidade da utilização do micro-organismo em sua forma habitat natural		Formação de gradientes de temperatura	MITCHELL et al, 2006.
Redução da utilização da água no processo em comparação a fermentação submersa			
Altos rendimentos			
Diminuição de custos nos quais o processo necessita da operação unitária de secagem.			

Tradicionalmente, os substratos para FES são resíduos ou subprodutos da agroindústria (PANDEY, 2003) que não apresentam grande interesse para segmentos industriais, mas podem gerar elevado valor agregado.

Desta forma, a produção de esporos de *Bacillus subtilis* pela técnica de fermentação em estado sólido é fundamentada na facilidade de execução, nos baixos custos, e alta produtividade.

Esta bactéria também é considerada um micro-organismo termófilo, resistente e sobrevivente a gradientes de temperatura. Quando não existe esta resistência microbiana, os leitos de substratos sólidos podem alternativamente serem aerados e resfriados com o uso do fluxo forçado de ar úmido (MITCHELL et al., 2000; NAGEL et al., 2001; MITCHELL et al., 2003), o que não é necessário para este micro-organismo. Trata-se, portanto, de um microrganismo estratégico para uso em FES, pois é capaz de suprir as limitações de transferência de oxigênio e elevação de temperatura.

Ainda é escasso o que se reporta na literatura sobre as tecnologias de FES com o objetivo de produção de esporos de *Bacillus*, sendo que na maior parte é necessário o enriquecimento do meio de cultivo com ingredientes sintéticos, como demonstrado no Quadro 5.

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E RENDIMENTO DE ESPOROS DE PROCESSOS DE FES COM A UTILIZAÇÃO DE *Bacillus*.

Micro-organismo	Composição do Meio	Produção (UFC / g)	Referência
<i>Bacillus licheniformis</i>	Palha de arroz em pó 300 g/kg Farelo de trigo 700 g/kg Glicose 40 g/kg Peptona 20 g/kg Extrato de levedura 20 g/kg KH ₂ PO ₄ 10 g/kg CaO 5 g/kg	1,7 . 10 ¹¹	ZHAO <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	6% de milhocina 4% de melaço 0,3% de extrato de levedura 0,5% de KH ₂ PO ₄ 0,25% de K ₂ HPO ₄ Farelo de milho e soja	4,8 . 10 ⁹	SHIM <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Bagaço de cana 2% de melaço de soja 0.005% de K ₂ HPO ₄ .H ₂ O 0.004% de MnSO ₄ .H ₂ O 0.004% de CaCl ₂ .6H ₂ O 0.005% de MgSO ₄ .7H ₂ O	3,3 . 10 ¹⁰	SELLA <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus thuringiensis</i>	55,21% de resíduos de cozinha 22,08% de farelo de trigo 11,04% de farelo de soja 11,04% de cascas de grãos 0,63% de íons mistos	5,0 . 10 ¹⁰	ZHANG <i>et al.</i> , 2013 (a)

2.11. RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA UTILIZÁVEIS COMO MEIOS DE FERMENTAÇÃO

- Casca de soja

A casca de soja é a parte envoltória do grão da soja, separada do embrião após a quebra do mesmo durante o processo industrial. Para cada tonelada de soja processada, são produzidos 50 kg da casca de soja, os quais são embalados em sacos, ou seja, comercializada na forma seca (BLASI *et al.*, 2000).

No âmbito agroindustrial, a casca de soja tem sido usada na fabricação de rações devido suas propriedades nutricionais. A composição nutricional da casca de soja tem como principal componente as fibras, sendo que deve conter em torno de 9,4% de proteína bruta (PB) e 74% de FDN na MS, sendo 46% composta de fibras como celulose e 18% de hemicelulose, conforme descrito na Tabela 3 (ANDERSON, 1988).

TABELA 3 - ESPECIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA CASCA DE SOJA

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICAÇÃO (g/Kg)
Umidade	Máx. 120
Proteína Bruta	Min. 90
Fibra Bruta	Máx. 420
FDA*	Min. 360 - Máx. 470
Matéria Mineral	Máx. 60

*FDA - Fibra em detergente ácido

FONTE: IMCOPA (2009)

Uma das vantagens de se utilizar este material como base fermentativa consiste no fato deste composto não apresentar problemas de conservação, possuir baixa atividade de água, podendo assim, ser armazenado em grande quantidade para ser utilizada na propriedade ao longo do ano, não possuindo problemas com contaminações fúngicas, ao contrário do que se observa com demais tipos de matérias primas como farinha de trigo e farelo de soja.

Adicionalmente, a casca é um ambiente favorável ao crescimento do *Bacillus subtilis*, assim como observado na produção do alimento tradicional japonês *natto*, que tem como base o crescimento na superfície do grão de soja. Além disso, trata-se de uma matéria prima abundante e barata, considerando que o estado do Paraná se destaca nacional e mundialmente como produtor de soja.

Comparada a outros tipos de matéria prima como o farelo de soja, torta de soja, a casca não causa maus odores durante o processo fermentativo, o que dispensa o uso de exaustores no âmbito industrial. Por exemplo, Oh et al. (2007) considera limitante a fermentação de torta de soja pela ação do *B. subtilis* por mais de 24h para finalidade alimentícia devido à liberação de odores desagradáveis.

Adicionalmente, o uso da casca corrobora com os conceitos de minimização de resíduos ambientais, recuperação, aproveitamento de subprodutos do setor, valorizando a cadeia produtiva da soja e gerando produtos de alto valor comercial.

Desta forma, a utilização da casca caracteriza-se como uma opção dotada de vantagens econômicas, ambientais e sendo uma alternativa estrategicamente produtiva.

- Farelo de soja

No processo de extração do óleo do grão de soja, o farelo é um dos subprodutos, sendo rico na sua composição proteica. Na Tabela 4, está representada uma composição química aproximada deste produto proveniente da soja.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA DE FARELO DE SOJA DESENGORDURADO

FARELO DE SOJA DESENGORDURADO		
COMPOSTOS	BASE ÚMIDA (%)	BASE SECA (%)
Proteína Bruta (Nx6,25)	52 – 54	56 - 59
Lipídeos Livres Bruto	0,5 - 1,0	0,5 - 1,1
Fibra Bruta	2,5 - 3,5	2,7 - 3,8
Cinzas	5,0 - 6,0	5,4 - 6,5
Umidade	6,0 - 8,0	0
Carboidratos	30 – 32	32 - 34

FONTE: IMCOPA (2009)

Os dados da composição de aminoácidos da proteína do farelo de soja são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA

Aminoácidos	Farelo de Soja (1)
Alanina	4,0
Arginina	7,0
Ácido Aspártico	11,3
Cistina	1,6
Ácido Glutâmico	17,2
Glicina	4,0
Histidina	2,7
Isoleucina	4,9
Leucina	8,0
Lisina	6,4
Metionina	1,4
Fenilalanina	5,3
Prolina	4,7
Serina	5,0
Treonina	4,2
Triptofano	1,2
Tirosina	3,9
Valina	5,3

FONTE: CENTRAL SOYA COMPANY, INC. FORT WAYNE, IN, 1994.

(1) Valores expressos em gramas de aminoácidos por 100 gramas de proteína.

O farelo de soja também é um subproduto muito utilizado em estudos de fermentação sólida. Dai et al. (2017) utilizou farelo de soja em um processo de fermentação sólida com *Bacillus subtilis*, observando de forma conclusiva que o fermentado apresentou aumento do valor nutricional e das atividades antioxidantes do farelo de soja, bem como uma forte atividade contra os efeitos da hipertensão. A patente desenvolvida por Seo et al. (2011) também utiliza farelo de soja fermentado com *Bacillus subtilis* TP6 no regime de fermentação sólida, com o objetivo de remover os fatores antinutricionais e melhorar a qualidade do produto. Ying et al. (2009) apresentaram a fermentação sólida em saco plástico contendo a mistura de farelo de soja e farelo de trigo como substrato com cepas de *B. subtilis* MA139 co-inoculada com *S. cerevisiae* e *Lact. Fermentum*, numa fermentação de 10 dias. Tendo como estratégia de produção alimentícia probiótica de baixo custo, Ying et al. (2009) observaram que o alimento controlou com sucesso o crescimento de enterobacteriaceae.

- Melaço de soja

O melaço de soja é, desta forma, um subproduto industrial que, devido às suas propriedades, é considerado útil em diversas aplicações em processos biotecnológicos, principalmente pelo teor de açúcares fermentáveis e economicamente, por tratar-se de um subproduto industrial.

Para a obtenção deste subproduto, são seguidas as etapas de extração em duas correntes que se separam na saída do extrator: uma “corrente líquida” e outra “corrente sólida”. Da corrente sólida, obtém-se o farelo concentrado de soja. Já a corrente líquida, também chamada de micela, é composta por álcool etílico, água e os açúcares que foram removidos do farelo umedecido com solução de álcool etílico e água. Esta corrente originará o melaço de soja após seguir os processos de desalcoolização (recuperação total do álcool utilizado no processo) e concentração dos açúcares, gerando o melaço de soja. A concentração usual de saída dos concentradores (concentram o teor de açúcar no melaço) é de 75 °Brix (IMCOPA, 2009).

Os principais açúcares que compõe o melaço de soja são estaquiose (84 g/L) e rafinose (23 g/L), seguido de glicose (8 g/L), frutose (8 g/L) e sacarose (7 g/L). A sua composição bioquímica está demonstrada na Tabela 6.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E TEOR DE CINZAS E UMIDADE DO MELAÇO DE SOJA LÍQUIDO E DO MELAÇO DE CANA EM PÓ

COMPOSIÇÃO (%)	MELAÇO DE SOJA LÍQUIDO ¹	MELAÇO DE CANA EM PÓ ²
Umidade	29,96	4,49
Açúcares totais	46,97	73,49
Proteína bruta	6,97	2,84
Lipídeos	9,72	0,40
Cinzas	34,78	18,77

¹Produzido por: IMCOPA – Importação, exportação e indústria de óleos S.A. (Araucária, PR, Brasil);

²Produzido por Indumel - Indústria e comércio de melaço Ltda. (Sertãozinho, SP, Brasil).

- Melaço de cana

O melaço de cana é o caldo da cana-de-açúcar concentrado pela evaporação da água até que atinjam teor de sólidos entre 65 e 75%. A sacarose é o açúcar predominante na composição do melaço de cana.

Possui manganês, que é um íon responsável pela indução do processo esporulativo em bactérias. Além disso, trata-se de uma matéria-prima abundante no Brasil, de fácil estocagem e de preço acessível, o que o torna particularmente atrativo do ponto de vista industrial.

A Tabela 7 contém as informações do descritivo da composição do melaço de cana.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE CANA

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE	RESULTADO
Acidez total (ácido acético)	g/Kg	5,6
ART	%	59,68
Água – Karl Fischer	% m/m	20,48
Amido	mg/kg	1709
Brix refratômetro 20°C	%	82,62
Cálcio	mg/kg	11455
Cinzas	% m/v	8,7
Cobalto	mg/kg	1
Cobre	mg/kg	4,2
Cor	UI	63573
Dextrana	mg/kg	6073
Ferro	mg/kg	71
Fósforo Total	mg/L	863
Frutose	% m/m	7,9
Glucose	% m/m	6,98
Magnésio	mg/kg	3991
Manganês	mg/kg	29,1
pH	-	5,92
Potássio	mg/kg	25572
Pureza	%	42,1
Resíduos Insolúveis gravimétricos	mg/kg	952
Sacarose	% m/m	39,9
Sódio	mg/kg	119
Sulfito	mg/kg	2114
Zinco	mg/kg	6,2

METODOLOGIA: Reipert AR200 – Digital Refractometer Catalog N°13950000

- Milhocina (*corn steep liquor*)

Conhecida como *corn steep licor*, ou água de maceração do milho, a milhocina é um subproduto industrial com potencialidades e aplicações na fermentação sólida por suas características peculiares, que contam com altas quantidades de matéria orgânica. Fonte de nitrogênio (o extrato concentrado contém aproximadamente 4%) e de aminoácidos (alanina, arginina, ácido glutâmico, isoleucina, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, metionina e cisteína), este subproduto é eficientemente metabolizado pelos microrganismos (STRAZZI, 2015).

No processo de produção de farinha de milho é realizada uma fermentação láctica por bactérias homo-fermentativas *Lactobacillus* e, em presença de dióxido de enxofre, sob condições específicas, as proteínas presentes no milho são convertidas a peptídeos e

são liberados açúcares simples. A fermentação láctica termina quando a concentração de SO_2 alcança 0,04%, o ácido láctico chega a 1-1,5% e o pH atinge um valor próximo a 4. O sobrenadante obtido é filtrado e concentrado, e corresponde à milhocina (*corn steep liquor*), a qual é considerada um subproduto do processo industrial, rico em carboidratos, nitrogênio, vitaminas e minerais (DWIARTI et al., 2007; LAU et al., 2010; MAZUTTI et al., 2010; OKAFOR, 2007).

Uma das aplicações da milhocina (*corn steep liquor*) consiste na utilização deste subproduto como alimento complementar na fabricação de ração e fonte de nitrogênio em processos fermentativos, podendo ser substituída pelas fontes de nitrogênio (3,7%) comerciais utilizadas tradicionalmente em processos biotecnológicos (extrato de levedura, sulfato de amônio, glutamato monossódico). Este subproduto já foi utilizado estrategicamente por vários autores para reduzir o custo do meio de cultura utilizado para a produção de enzimas por microrganismos (BURKERT, 2004; KONA & QURESHI, 2001; KUMAR, 1999; LEE, 2003).

Adicionalmente, é uma fonte de matéria prima regional, considerando que estado do Paraná é um dos maiores produtores de milho produzindo uma safra anual de cerca de 12 milhões de toneladas.

A Tabela 8 apresenta a composição da Água de Maceração do Milho (Milhocina)

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DA MILHOCINA (*corn steep liquor*)

COMPOSIÇÃO MILHOCINA	
Nitrogênio (%p)	3,7
Fósforo (%p)	1,3
Potássio (%p)	7
Carbono Orgânico (%p)	23
Enxofre (mg/kg)	5.149
Ferro (mg/kg)	23
Manganês (mg/kg)	21
Zinco (mg/kg)	75
Boro (mg/kg)	5,2
Cobre (mg/kg)	6,1
Cobalto (mg/kg)	0,2
Molibdênio (mg/kg)	1,8
Sódio (mg/kg)	1.114,30
Cálcio (mg/kg)	512,4
Cobre (mg/kg)	6,5
Ferro (mg/kg)	110,8
Magnésio	4.210,70
pH	4,4
Viscosidade (cP)	16,7
Densidade (g/L)	1,17
Resíduo evap. 120°C (%p)	38,7
Teor de cinzas (%p)	7,2
Alanina	1.075,00
Arginina	725
Ác. Aspártico	1.129,00
Glicina	1.100,00
Isoleucina	582
Leucina	1.855,00
Ácido glutâmico	3.317,00
Lisina	933
Cistina	1.191,00
Metionina	680
Fenilalanina	648
Tirosina	643
Treonina	692
Triptofano	13
Prolina	2.187,00
Valina	957
Histidina	664
Serina	968
TOTAL	19.359,00

FONTE: Laboratório de processos biotecnológicos UFPR

2.12 CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO PROBIOTICO

Estrategicamente, a produção de um aditivo probiótico em altas concentrações celulares permite que o produto possa ser diluído juntamente com a ração animal e ainda assim manter os benefícios ao hospedeiro.

No Brasil, o setor agropecuário é regido pelo ministério da agricultura e pecuária e particularmente, os aditivos alimentares voltados à parte animal são regidos pela normativa 13/2004 (30 de novembro de 2004), (MAPA, 2011). Esta normativa enquadra os alimentos probióticos que podem ser incorporados à ração como aditivos zootécnicos equilibradores da microbiota do trato digestório, cuja função é auxiliar na recomposição da microbiota do trato digestivo dos animais, diminuindo o número dos microrganismos patogênicos ou indesejáveis.

De acordo com o MAPA (2011), classifica-se como aditivo zootécnico “toda a substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais”. Mais especificamente, a Instrução Normativa 13/2004, define os probióticos como *“micro-organismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio”*.

O produto deve conter em sua rotulagem a identificação da(s) cepa(s), a quantidade das unidades formadoras de colônias por grama-UFC/g, a indicação de uso e o destino (alimentação animal) e, eventualmente, uma recomendação relativa à segurança de uso (quando houver) (ANTUNES et al., 2007). Atualmente, é conhecido que a recomendação de ingestão diária de micro-organismos viáveis deve estar no mínimo na faixa de 10^8 a 10^9 UFC (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008).

Quanto à comprovação de eficácia do produto, a documentação deve incluir o laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e os testes adicionais de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares. (BRASIL, 2005).

Além disso, os rótulos e etiquetas, além de cumprirem o que estabelece o Decreto nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976, deverão conter obrigatoriamente os seguintes itens.

- Os dizeres de Rótulo Registrado no Ministério da Agricultura sob o nº;
- Condições de conservação;
- Número do lote;
- Data da fabricação;
- Prazo de validade;
- Carimbo oficial da Inspeção Federal;
- Registro:

Para registro do produto, deve-se descrever a nomenclatura, propriedades, segurança de utilização, condições de utilização, além de dados tecnológicos de estabilidade e conservação do produto, conforme enumerado nos tópicos abaixo.

Nomenclatura:

- i - designação taxonômica da cepa segundo os códigos internacionais de nomenclatura;
- ii - denominação e local da coleção de culturas onde a cepa está registrada ou depositada e número de registro ou de depósito;
- iii - indicar se foi obtida por manipulação genética;
- iv - número de unidades formadoras de colônias por grama - UFC/g.

- Propriedades

Efeito principal:

- a) apresentar dados relativos à eficácia;

A comprovação da eficácia deverá ser fundamentada em publicações científicas internacionalmente aceitas ou por experimentação própria para a(s) espécie(s) animal (is), categoria(s) e para as dosagens declaradas.

- b) justificar a presença de cada um dos agentes, no caso de uma mistura de agentes;
- c) outros efeitos;

- Segurança de utilização

Descrever o processo de isolamento e informar os testes de controle adotados para comprovação da segurança do microrganismo quanto à toxicidade crônica/carcinogênese e transmissão de plasmídeo.

- Condições de utilização do produto:

a) utilizações previstas nos produtos destinados à alimentação animal (espécies ou categorias de animais, tipo de alimento para animais, período de utilização, entre outros);

b) doseamento proposto nas pré-misturas e nos produtos (unidades adequadas de atividade biológica, tais como UFC por grama de produto para os microrganismos ou unidades de atividade por grama - U/g para as preparações enzimáticas);

c) recomendações relativas à segurança de utilização do produto no que diz respeito às espécies-alvo, ao consumidor e ao ambiente;

d) quando houver medidas de prevenção dos riscos e meios de proteção na fabricação e na utilização;

- Dados tecnológicos

Estabilidade

Apresentar o protocolo de ensaios comprovando a viabilidade dos microrganismos, para o prazo de validade proposto, tanto na embalagem original, como nas condições de uso e conservação do produto.

Descrição do processo

Descrição do processo de fabrico e dos métodos utilizados no que diz respeito ao controle da qualidade do produto quando do fabrico.

- Resumo das características desejáveis

As características desejáveis dos probióticos são descritas no Quadro 6.

QUADRO 6 - CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DOS PRODUTOS PROBIÓTICOS

CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIAS
Possui quantidade mínima de unidades formadoras de colônias	A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.	RITCHIE ROMANUK http://portal.anvisa.gov.br
Sobreviver à passagem pelo trato gastro intestinal.	O micro-organismo deve ser resistente à ação de sucos gástricos, presença de sais biliares e enzimas digestivas, serem capazes de manter sua atividade metabólica no intestino e assim, realizar os mecanismos de probiose.	SAAD, 2006;
Ser não patogênico e não tóxico	Devem ser seguros para utilização com a caracterização e identificação do microrganismo	SANTOS, et al., 2005.
Habilidade de colonização do epitélio intestinal e consequente exclusão competitiva	Deve competir com patógenos por sítios de ligação e nutrientes (Exclusão competitiva) Os micro-organismos benéficos exercem a função de proteção e formam uma barreira que impedem a adesão de microrganismo patogênico, por meio da ocupação pela ocupação dos sítios de adesão celulares da mucosa com a microbiota autóctone.	RIBEIRO, et al., 2007. PAIXÃO & CASTRO 2016. CALLAWAY, et al., 2008. COLLADO, et al., 2010.
Produção de compostos de ação contra microrganismos patogênicos	A eliminação de patógenos acontece, também, por meio da síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis (ácido acético e ácido láctico) e peróxido de hidrogênio, ou seja, competir diretamente com agentes patogênicos intestinais, através da libertação de substâncias antibacterianas, tais como as bacteriocinas;	KHOCHAMIT, et al., 2015
Manter a estabilidade e a viabilidade durante o período de processamento, estocagem e transporte.	Nos parâmetros tecnológicos de produção impõe-se o desafio de manter a estabilidade e a viabilidade, em uma quantidade determinada ótima, durante todo o prazo de vida de prateleira do produto. Um aspecto que contribui para a estabilidade do produto é a redução do percentual de umidade, o que diminuiu a atividade metabólica de possíveis contaminantes. Aspectos como temperatura, acidez, e oxidação também influenciam no processo de preservação do produto durante o período de estocagem. Após o tempo de vida útil, o produto probióticos deverá ser quantificado em UFC/g massa de massa seca.	TRIPATHI & GIRI, 2014.
Realizar benefícios ao hospedeiro	Melhorar a sobrevivência frente à infecção por bactérias nocivas Diminuir a mortalidade	HMANI, et al., 2017.
Possuir atividade anti-inflamatória, anti-mutagênica e imunoestimulatória	Estimular componentes do Sistema imunológico; Aumento da taxa de produção das células de defesa; Aumento da resposta secretada por imunoglobulinas;	RIBEIRO, et al., 2007. LANKAPUTHRA, et al., 1998.
Melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar	Aumentar o apetite do animal	BITTERN COURT, et al., 2011. OPALINSKI, et al., 2007.

2.13 - CONCLUSÃO

Os avanços em áreas de produtos biotecnológicos proporcionam uma grande oportunidade para o desenvolvimento de produtos probióticos para consumo humano e animal.

No setor agroindustrial, o uso indiscriminado de antibiótico como promotores de crescimento põe em risco a saúde humana e animal, devido aos resíduos na carne, que implicam em seleção de bactérias resistentes. Desta forma, cada vez mais países estão restringindo o uso de tais compostos como promotores de crescimento e estão optando pelo uso de alimentos funcionais como substituição ao uso de antibióticos, seguindo a estratégia de eliminação dos patógenos pela ação de microrganismos probióticos.

Estudos demonstram que várias estirpes probióticas têm mostrado eficácia na melhora dos parâmetros zootécnicos de desempenho animal, assim como agem de forma preventiva aos ataques de micro-organismos patogênicos ao formarem um filme que impede a adesão de patógenos, ao secretar substâncias antimicrobianas e ao desenvolver o mecanismo de inibição por competição.

Com os progressos no setor de probióticos, tem se estudado a resistência destes microrganismos ao ambiente gástrico, bem como sua adaptação e a colonização organismos ao ambiente intestinal. É cada vez mais proeminente a necessidade de produzir alimentos livres de resíduos tóxicos, cultivados como estirpes dotadas de características robustas e capacitadas a executar os mecanismos de probiose em sua melhor forma, fato corroborado pelo número de patentes e pelo surgimento de novos produtos lançados neste mercado novos produtos.

É claro que para cada produto probiótico deve-se considerar as variações fisiológicas de cada espécie animal, como idade, condição de crescimento, tipos de dieta e variações de pH intestinal, que causam diferenças na germinação dos esporos, no metabolismo microbiano e consequentemente, na forma de atuação dos produtos. Desta forma, também são requeridos estudos de efeitos da cepa específica componente do produto, pois existem também variações nas estirpes microbianas; ainda que sejam de mesmo gênero e espécie, algumas cepas podem se adaptar melhor ao trato gastro intestinal e, consequentemente, apresentar melhores índices de aumento nos parâmetros zootécnicos (ganho de peso, conversão alimentar, diminuição da mortalidade, melhora da imunidade, diminuição de doenças).

Como os mecanismos de ação dos probióticos relatam o resultado da interação entre o hospedeiro e o micro-organismo probiótico, mais estudos deverão ser focados nas interações hospedeiro-probiótico para elucidar o mecanismo de ação. Embora geralmente considerados seguros, sempre haverá questionamentos sobre a eficácia e segurança de probióticos, porém estes questionamentos não têm servido de limitação para que novos produtos comerciais sejam lançados, desde que sejam respeitadas as normas de produção e composição, os testes de segurança alimentar e citotoxicidade, assim como a comprovação de seus benefícios por meio de testes *in vitro* e *in vivo* exigidos pelos órgãos fiscalizadores competentes , como o MAPA no Brasil e a OMS mundialmente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 314–322, 2012.
- AGERHOLM-LARSEN L., RABEN A., HAULRIK N., et al. Effect of 8-week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **European Joournal of Clinical Nutrition**, 54(4): 288-97, 2000.
- ANDERSON, S. J.; MERRILL, J. K.; MCDONNELL, M. L.; KLOPFENSTEIN, T. J. Digestibility and Utilization of Mechanically Processed Soybean Hulls by Lambs and Steers. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 11, p. 2965–2976, 1988.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; et al. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83–90, 2007.
- APPELT, M. D.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; et al. Levels of probiotics in animal and vegetal origin feed for broilers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 765–771, 2010.
- APS, L. R. M. M.; DINIZ, M. O; PORCHIA, B. F. M. M.; et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 20, p. 2328–2334, 2015.
- AROWOLO, M. A.; HE, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2018.
- AYALA, F. R.; BAUMAN, C.; COGLIATI, S.; et al. Microbial flora, probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. **Microbial Cell**, v. 4, n. 4, p. 133–136, 2017.
- BEAUCHEMIN KA, MCGINN SM, MARTINEZ TF, MCALLISTER TA. Use of condensed tannin extract from quebrachotrees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**.85:1990–1996, 2007
- BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. **Anais: In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**. p. 1. Apinco, 1993.
- BHAT A.R., IRORERE V.U., BARTLETT T., HILL D., KEDIA G., MORRIS M.R., CHARALAMPOPOULOS D., RADECKA I., *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria, 2013.

BITTERNCOURT, L. C.; SILVA, C. C. DA; GARCIA, P. D. S. R.; et al. Influence of a probiotic on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2739–2743, 2011.

BLASI, D.A.; DROUILLARD, J.S.; TITGEMEYER, E.C. et al. Soybean hulls: Composition and feeding value for beef and dairy cattle. MF-2438. Kansas State Univ., Manhattan, KS. 2000.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Biores. Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217–225, 2008.

CASADEI, R.M. **Uso racional de antimicrobianos na produção animal**, 2012.

CHEN X, CHEN S, SUN M, YU Z. High yield of poly- γ glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**. 2005;

CHEN, H.; MCGOWAN, E. M.; REN, N.; et al. *Nattokinase*: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. **Biomarker Insights**, v. 13, 2018.

CHISTYAKOV, V.; MELNIKOV, V.; CHIKINDAS, M. L.; et al. Poultry-beneficial solid-state *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 fermented soybean formulation. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 34, n. 1, p. 25–28, 2015.

COHN, F. E., Untersuchungen uber Bakterien, Belir. **Bioi. Pf/Inz.**, 1: 124-224, 1872.

COLENUTT, C.; CUTTING, S. M. Use of *Bacillus subtilis* PXN21 spores for suppression of *Clostridium difficile* infection symptoms in a murine model. **FEMS microbiology letters**, v. 358, n. 2, p. 154–161, 2014.

COLLADO, M. C.; GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. Chapter 23 - Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. In: R. R. Watson; V. R. Preedy (Orgs.); **Bioactive Foods in Promoting Health**. p.353–370, Boston: Academic Press. 2010.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.

CORCIONIVOSCHI, NICOLAE & DRINCEANU, DAN & POP, IOAN & STACK, DEIRDRE & STEF, LAVINIA & JULEAN, CĂLIN & BOURKE, BILLY. The Effect of Probiotics on Animal Health. **Animal Science and Biotechnologies**, 43, 2010.

- CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S.; MATTOS, E. S. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467–473, 2003.
- CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, 2011.
- DAI, C., MA, H., HE, R., HUANG, L., ZHU, S., DING, Q., LUO, L. Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. **LWT** 86, 1–7. 2017
- DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 1, p. 1–20, 1999.
- DRIKS, A. Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 59, n. 3, p. 389–391, 2002.
- DRIKS, A. The *Bacillus* spore coat. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1249–1251, 2004.
- DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2161–2171, 2004.
- DWIARTI, L.; OTSUKA, M.; MIURA, S.; YAGUCHI, M.; OKABE, M. Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by *Aspergillus terreus* TN484-M1. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3329–3337, 2007.
- DOMINGUES, C. H. F.; SANTOS, E. T.; CASTIBLANCO, D. M. C.; QUADROS, T. C. O.; PETROLI, T. G.; DUARTE, K. F.; JUNQUEIRA, O. M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação. **Revista Agrocientífica**, v.1., n.1, p. 7-16, 2014
- EHRENBERG, C. G. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. In **Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835**, pp. 143–336 (in German), 1835.
- EIJLANDER, R. T.; DE JONG, A.; KRAWCZYK, A. O.; HOLSAPPEL, S.; KUIPERS, O. P. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D685–D691, 2014.
- ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

FACCHINI, F. D. A. Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica), Universidade de São Paulo, 2010.

FALLAH, R.; MIRZAEI, E. Effect of adding L-carnitine and Protexin(R) probiotic on performance and some blood parameters of ostrich chickens. **Brazilian Journal of Biology**, v. 3, p. 1–12, 2016.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2002.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2001.

FIORINI, G.; CIMMINIELLO, C.; CHIANESE, R.; et al. *Bacillus subtilis* selectively stimulates the synthesis of membrane bound and secreted IgA. **Chemioterapia: International Journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy**, v. 4, n. 4, p. 310–312, 1985.

FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do Efeito de Prebióticos (MOS), Probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e Promotor de Crescimento na Alimentação de Frangos de Corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2005.

FOLIGNÉ B., PEYS E., VANDENKERCKHOVE J., VAN HEMEL J., DEWULF J., BRETON J., et al. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. **Clinical And Nutrition**. 31 p.987–994, 2012.

FUJIYA M., MUSCH M. W., NAKAGAWA Y., HU S., ALVERDY J., KOHGO Y., ET AL. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. **Cell Host And Microbe** 1 p.299–308, 2007.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, 1989.

GAO Z, WU H, SHI L, ZHANG X, SHENG R, YIN F & GOONERATNE R. 2017. Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. **Animal Nutrition**, 3: 109-113. DOI: 10.1016/j.aninu,2017.

GIORNO, R.; BOZUE, J.; COTE, C.; et al. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 691–705, 2007.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. **Global Industry Analysts Research Reports**, 2018.

GOLDIN B., GUALTIERI L, MOORE R. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. **Nutrition And Cancer**, 25(2): 197-204, 1996.

GUO, M.; WU, F.; HAO, G.; et al. *Bacillus subtilis* Improves Immunity and Disease Resistance in Rabbits. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

HARWOOD, C. R. *Bacillus*. **Biotechnology Handbooks. 2**. Edited by T. Atkinson & R. F. Sherwood. New York & London: Plenum, 1989.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HMANI, H.; DAOUD, L.; JLIDI, M.; et al. A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 8, p. 1157–1166, 2017.

HOA, T. T.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; et al. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3819–3823, 2001.

HOFFMANN, H. L.; PHARM, D. Gram-Positive Infections, in Pharmacotherapy Self-Assessment Program: Infectious Diseases, 5th Ed. **American College of Clinical Pharmacy**, Kansas City, MO, 2005.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 813–835, 2005.

HONG, H. A.; KHANEJA, R.; TAM, N. M. K.; et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 134–143, 2009.

HOROSHEVA, T. V.; SOROKULOVA, I.; VODYANOY, V. Efficacy of *Bacillus* probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **JMM Case Reports**, v. 1, n. 3, 2014.

- HUANG, J.-M.; LA RAGIONE, R. M.; NUNEZ, A.; CUTTING, S. M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **FEMS Immunology And Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 195–203, 2008.
- HUANG, Q.; XU, X.; MAO, Y.; et al. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. **Animal Science Journal Nihon Chikusan Gakkaiho**, v. 84, n. 3, p. 247–252, 2013.
- HUANG, X.; LU, Z.; BIE, X.; et al. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, 2007.
- IMCOPA IMPORTAÇÃO EXPORTAÇÃO E INDÚSTRIA DE ÓLEOS LTDA. Frederico José Busato Júnior. **Processo industrial de produção do farelo concentrado de soja e melaço de soja**. PI0704760-6 A2, 30 novembro 2007, 28 julho 2009.
- PACCEZ J.D., H.D. NGUYEN, W.B. LUIZ, et al. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine** **25**: 4671–4680, 2007.
- JEONG J. S., KIM I. H.; Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, 2014.
- JOSEPH, B.; DHAS, B.; HENA, V.; RAJ, J. Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 942–946, 2013.
- JUNG, S.J.; HOUDE, R.; BAURHOO, B.; ZHAO, X.; LEE, B.H. Effects of galacto-oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. **Poultry science** , v.87, n.9, p.1694-1699, 2008.
- JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE K.F.; **Probióticos na nutrição de suínos: alternativa ou solução?**, 2007.
- KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M.; M.B, R.; S.U, A. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 361–364, 2004.
- KAILASAPATHY K., CHIN J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium spp. **Immunology And Cell Biology**, 78(1): 80-8, 2000.

KAY, D.; WARREN, S. C. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Morphological changes. **The Biochemical Journal**, v. 109, n. 5, p. 819–824, 1968.

KHOCHAMIT, N.; SIRIPORNADULSIL, S.; SUKON, P.; SIRIPORNADULSIL, W. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. **Microbiological Research**, v. 170, p. 36–50, 2015.

KIM, S.-Y.; KIM, J. Y.; KIM, S.-H.; et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS letters**, v. 581, n. 5, p. 865–871, 2007.

KITAGAWA, M.; SHIRAISHI, T.; YAMAMOTO, S.; et al. Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, *Natto*, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 127, 2017.

KLEIN, C.; ENTIAN, K. D. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied Environ Microbiology*, v. 60, n. 8, p. 2793–2891, 1994.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Bioresearch And Technology**, v. 78, n. 2, p. 123–126, 2001.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 8, n. 2, p. 517–531, 1989.

KRAŠKO, J. A.; ŽILIONYTĖ, K.; DARINSKAS, A.; et al. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5098–5104, 2018.

KUBO, Y.; ROONEY, A. P.; TSUKAKOSHI, Y.; et al. Phylogenetic Analysis of *Bacillus subtilis* Strains Applicable to *Natto* (Fermented Soybean) Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6463–6469, 2011.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 5, p. 561–594, 1999.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E.; et al. Probiotics on poultry production. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457–1465, 2014.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrointestinal: aditivos. In: FUNDAÇÃO LANKAPUTHRA, W. E.; SHAH, N. P. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. **Mutation Research**, v. 397, n. 2, p. 169–182, 1998.

LAU, M. W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and

Zymomonas mobilis AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 11, 2010.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C. DE; GONZALES, E.; et al. Probiotic in diet or inoculated in fertilized eggs: 1. performance of broiler chicks challenged with *Salmonella Enteritidis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1509–1516, 2010.

LEE, P. C. et al. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 63–67, 2003

LEFEVRE, M.; RACEDO, S. M.; RIPERT, G.; et al. Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. **Immunity & Ageing : I & A**, v. 12, 2015.

LEI, K.; LI, Y.; WANG, Y.; et al. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* B10 on biochemical and molecular parameters in the serum and liver of high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 6, p. 487–495, 2015.

LEVIN, P. A.; GROSSMAN, A. D. Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 630–635, 1998.

LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 406–415, 1981.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

LIMA, T. de. Modelo de inferência para a estimação da umidade do leite de um biorreator de fermentação no estado sólido. **Dissertação de Mestrado – UFPR**, 2009.

LIU, Y.-P.; LIU, X.; DONG, L. Lactulose plus live binary *Bacillus subtilis* in the treatment of elders with functional constipation. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 92, n. 42, p. 2961–2964, 2012.

LUEGAS, J.P., ALBINO, J.T., TABERNARI, F., BARROS, V.M., PESSOA, G.S., ROSTAGNO, H.S. Efeito da adição de probióticos na dieta ileal da matéria seca sobre digestibilidade e da proteína de frangos de corte. **Archivos de Zootecnia** 64, 199–204, 2015.

MAKINEN, K.; BERGER, B.; BEL-RHLID, R.; ANANTA, E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 356–365, 2012.

- MARSHALL B.M., LEVY SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**; 24(4):718-33, 2011.
- MARTEAU, P. RAMBAUD, JC. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiological Reviews**, 12: 207-20, 1993.
- MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.
- MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209–223, 2015.
- MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 109–114, 2010.
- MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 133, n. 1, p. 3–18, 1994.
- MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33–44, 2013.
- MELO B. Na mira dos antibióticos. **Dinheiro Rural**, 2018.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61–138, 2000.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., **Solid-state fermentation bioreactors**. Springer-Verlag, Berlin, 2006
- MITCHELL, D.; F. VON MEIEN, O.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137–147, 2003.
- NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. **Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation**. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 72, 2. 2001
- NEWBOLD, CHARLES. **Probiotics for ruminants**, 1996.

NGUYEN, V. A. T.; HUYNH, H. A.; HOANG, T. V.; et al. Killed *Bacillus subtilis* spores expressing streptavidin: a novel carrier of drugs to target cancer cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 6, p. 528–541, 2013.

OETTERER, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1. Ed. São Paulo, 2006.

OGGIONI, M. R.; POZZI, G.; VALENSIN, P. E.; GALIENI, P.; BIGAZZI, C. Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 325–326, 1998.

OGUNLEYE A., BHAT A., IRORERE V.U., HILL D., WILLIAMS C., RADECKA I. Poly- γ -glutamic acid: Production, properties and applications. **Microbiology**. **161**:p.1–17, 2015.

OH, S. M. et al. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus sp.* **Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 509-514, 2007.

OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. 1. Ed. Science Publishers, South Carolina, USA, 2007

OKSANEN P.J., SALMINEN S., SAXELIN M., et al. Prevention of travellers' diarrhea by *Lactobacillus* GG. **Annals of Medicine**, 22(1): 53-6, 1990.

OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; CARICATI, A. T. P.; ABDULACK-LOPES, F.; et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 23, p. 3351–3354, 2012.

OLMOS, J.; J, P.-M. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 6, n. 7, p. 361–365, 2014.

OOSTRA, J.; LE COMTE, E. P.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 13–24, 2001.

OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; et al. On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis* - strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 99–103, 2007.

PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. DOS S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro - doi: 10.5102/ucs.v14i1.3629. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85–96, 2016.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Solid-State Fermentation., v. 13, n. 2, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state

fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 86, 2007.

PARKER R. B., "Probiotics: the other half of the antibiotic story," **Animal Nutrition and Health**, vol. 29, pp. 4–8, 1974.

PESTKA J.J. Food, diet, and gastrointestinal immune function. **Advances In Food And Nutrition Research**, 37: 1-66, 1993.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579–586, 2004.

POORMONTASERI, M.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; KALANTARI, T. The effects of probiotic *Bacillus subtilis* on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type a in Caco-2 cell culture. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 150, 2017.

PRAZDNOVA, E. V.; CHISTYAKOV, V. A.; CHURILOV, M. N.; et al. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 549–554, 2015.

PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS microbiology letters**, v. 217, n. 2, p. 133–139, 2002.

QIN, C.; GONG, L.; ZHANG, X.; et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. **Animal Nutrition**, 2018.

RASMUSSEN, SIMON & NIELSEN, HENRIK & JARMER, HANNE. The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiology* 73, 1043-1057. **Molecular microbiology**. 73. 1043-57. 10.1111/j.1365-2958.2009.06830.x, 2009.

REAL, G.; HENRIQUES. A. O. Controle da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, nº 68: 2-12, 2001.

REINWALD, S.; WEAVER, C. M. Soy Components vs. Whole Soy: Are We Betting Our Bones on a Long Shot? 123. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2312S-2317S, 2010.

RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K.; CANAL, C. W.; et al. Effects of prebiotics and probiotics on the colonization and immune response of broiler chickens challenged with *Salmonella enteritidis*. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 193–200, 2007.

RIESENMAN PJ, NICHOLSON WL. Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation. **Applied and Environmental Microbiology**. 66(2): 620-626, 2000.

RINGEL, Y.; RINGEL-KULKA, T. The Intestinal Microbiota and Irritable Bowel Syndrome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 49, p. S56, 2015.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SALMINEN, ISOLAURI S., SALMINEN E. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 5: 53-6, 1996.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95–104, 2002.

SANDERS, M. E.; HAMILTON, J.; REID, G.; GIBSON, G. A nonviable preparation of *Lactobacillus acidophilus* is not a probiotic. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 6, p. 886, 2007.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *SporoLactobacillus*, and *BreviBacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 101–110, 2003.

SANDERS, M. Probiotics. **Food Technology**, 53(11): 67-77, 1999.

SANTOS, G. DE LOS; RODRIGO, J.; TURNES, C. G. Probiotics in aviculture. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741–747, 2005.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 533–545, 2015.

SEO, S.H., CHO, S.-J., HONG, Y.-H., RYU, J.-H., KANG, J.H., CHI, H., PARK, S.-W., PYUN, Y.R., CHO, S.C., KOOK, M.C., PARK, H.H. Method for preparing a fermented soybean meal using *bacillus* strains. **WO2011031020A2**, 2011.

SHARIF, A. et al. The Role of Probiotics in the Treatment of Dysentery: a Randomized Double-Blind Clinical Trial. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, 2017.

SHEWALE, R. N.; SAWALE, P.; KHEDKAR, C.; SINGH, A. Selection criteria for probiotics: A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 9, p. 17–22, 2014.

SHIM, Y. H.; SHINDE, P. L.; CHOI, J. Y.; et al. Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 23, n. 4, p. 521–529, 2010.

SHIMIZU, M. Functional Food in Japan: Current Status and Future of Gut-Modulating Food. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, p. 4, 2012.

SHOBHARANI, P. PADMAJA R.J., HALAMI P.M.. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512 **Res. Microbiology**, 166 (6), pp. 546-554, 2015.

SIDHU, M; VAN DER POORTEN, D. The gut microbiome. *Australian Family Physician*; 46(4):206-211, 2017.

SPINOSA, M. R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 361–368, 2000.

STEINKRAUS, K. H. **Industrialization of indigenous fermented foods**, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, 2004.

STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Revista Visão Agrícola – USP/ESALQ**, n. 13, p. 146-150, Jul/Dez, 2015.

STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T. DE; GOMES, R. C.; et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181–194, 2007.

SUN, H.; LIN, Z.; ZHAO, L.; et al. *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate. **Parasites & Vectors**, v. 11, 2018.

SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5851–5855, 2010.

SUVA, M. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. **Journal of Current Research in Scientific Medicine**, v. 2, p. 65–72, 2017.

TAKEDA, K.; SASAKI, K.; OKUMURA, K. Extract of metabolic products of *Bacillus subtilis* AK augments natural killer cell cytotoxic activity. **Traditional & Kampo Medicine**, v. 3, n. 2, p. 100–106, 2016.

TAM N.K.M., et al.. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of Bacteriology** 188(7): p. 2692–2700, 2006.

TAN, I. S.; RAMAMURTHI, K. S. Spore formation in *Bacillus subtilis*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 3, p. 212–225, 2014.

TANG, Q.; YIN, K.; QIAN, H.; et al. Cyclic di-GMP contributes to adaption and virulence of *Bacillus thuringiensis* through a riboswitch-regulated collagen adhesion protein. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28807, 2016.

TEITELBAUM J., WALKER W. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**, 22: 107-38, 2002.

TOMPKINS, T. A.; XU, X.; AHMARANI, J. A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 93–106, 2010.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

UYENO, Y., S. SHIGEMORI, AND T. SHIMOSATO. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and Environments**. 30: 126-132, 2015.

VAZQUEZ, A. P. *Bacillus* species are Superior Probiotic Feed-Additives for Poultry. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 2, n. 3, 2016.

VUKOVIĆ, M. *Bacillus subtilis* IP 5832 (Flonivin BS) shortens the duration of the carrier state in patients with acute non-typhoid salmonella enteritis. **Medicinski Pregled**, v. 54, n. 1–2, p. 62–68, 2001.

WALLACE R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**. 72199429923003, 1994.

WANG, C. L.; NG, T. B.; YUAN, F.; LIU, Z. K.; LIU, F. Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis natto* T-2. **Peptides**, v. 28, n. 7, p. 1344–1350, 2007.

WANITSCHKE R., GOERG K.J., LOEW D. Differential therapy of constipation--a review. **International Journal Clinical Pharmacology And Therapeutics**, 41(1): 14–21, 2003.

WENG, Y.; YAO, J.; SPARKS, S.; WANG, K. Y. *Nattokinase*: An Oral Antithrombotic Agent for the Prevention of Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

WESSFLL, W. S. Caracterização De G-Pga Produzido Por *Bacillus subtilis* BL53. Recuperado em 05/08/2018, de **Lume**, 2015.

WESTSTRATE, J. A.; VAN POPPEL, G.; VERSCHUREN, P. M. Functional foods, trends and future. **The British Journal of Nutrition**, v. 88 Suppl 2, p. S233-235, 2002.

WOLFENDEN, R.E. & PUMFORD, NEIL & MORGAN, M.J. & SHIVARAMAIAH, SRICHAITANYA & WOLFENDEN, A.D. & PIXLEY, C.M. & GREEN, J & TELLEZ, GUILLERMO & HARGIS, B.M.. Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and Salmonella reduction in commercial turkey brooding houses. **Poultry Science**, 2011.

WU, Y.; SHAO, Y.; SONG, B.; et al. Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, p. 9, 2018.

XU, D.; CÔTÉ, J.-C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. Pt 3, p. 695–704, 2003.

YANAGISAWA Y, CHATAKE T, CHIBA-KAMOSHIDA K, NAITO S, OHSUGI T, SUMI H, YASUDA I, MORIMOTO Y. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis natto*. Acta Crystallographica Section F **Structural Biology Crystallization Communications** 2010;66:1670-1673, 2010.

YING, W., ZHU, R., LU, W., GONG, L. A new strategy to apply *Bacillus subtilis* MA139 for the production of solid-state fermentation feed. **Letters in Applied Microbiology** 49, 229–234. 2009.

ZAGHARI, M.; ZAHROOJIAN, N.; RIAHI, M.; PARHIZKAR, S. Effect of *Bacillus Subtilis* Spore (GalliPro[®]) Nutrients Equivalency Value on Broiler Chicken Performance. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 1, p. 3555, 2015.

ZHANG, W., QIU, L., GONG, A., CAO, Y., WANG, B. Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. **BioResources** 8, 1124–1135. <https://doi.org/10.15376/biores.8.1.1124-1135>, 2013.

ZHANG, Y.-R.; XIONG, H.-R.; GUO, X.-H. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 1, p. 31–36, 2014.

ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 155, n. 2, p. 343–347, 2013.

ZHOU, D.; ZHU, Y.-H.; ZHANG, W.; et al. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics generates Tr1 cells in weaned F4ab/acR– pigs challenged with an F4+ ETEC/VTEC/EPEC strain. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 95, 2015.

ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. Control of Established *Salmonella typhimurium* Intestinal Colonization with in vivo-Passaged Anaerobes. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 183–188, 1993.

CAPÍTULO II

3. SELEÇÃO DE SUBSTRATO E SUPORTE PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DA SOJA E CANA

3.1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola tornou-se uma importante atividade econômica em muitos países. Esta situação deve-se a fatores como o crescimento da demanda, a alta concorrência com outros setores de proteínas animais, o aumento da produtividade em função da melhoria genética, a nutrição e a gestão e a tendência para o consumo de carnes mais saudáveis. No entanto, na indústria avícola moderna, o sistema artificial de produção afeta o desenvolvimento da flora intestinal dos animais, pelos fatores como falta de contato com uma microbiota natural. Por muito tempo, a suplementação alimentar com antibióticos foi amplamente utilizada para estabilizar a flora intestinal e prevenir doenças. Atualmente, a restrição do uso de antibióticos em alimentos para animais como promotores de crescimento torna o uso de probióticos uma alternativa natural e segura para obter alimentos funcionais que proporcionam saúde e qualidade de vida para animais e consumidores (FARIA FILHO et al., 2006).

O uso de esporos de *Bacillus* como probióticos é atraente na produção de aditivos alimentares de aves, devido suas características de se manter termodinamicamente estáveis e sobreviverem à barreira gástrica a baixos custos de produção. O *B. subtilis* var. *natto*, micro-organismo utilizado no Japão para a produção do alimento natto (grãos de soja fermentado), demonstrou atividade probiótica e melhora do desempenho quando testado em frangos de corte, suínos (SAMANYA & YAMAUCHI, 2002; ZHOU et al., 2015) e bezerros (SUN et al, 2010).

Com base nas potenciais bactérias com potenciais probióticos, tem-se buscado desenvolver novos produtos probióticos que possam ser viáveis economicamente, e a utilização de subprodutos aliada à produção fermentativa em estado sólido (FES) tem se mostrado um campo atrativo e promissor.

O Brasil é um grande produtor de alimentos, neste contexto, se torna simultaneamente um produtor de resíduos alimentares. Uma estratégia ambientalmente sustentável inclui a utilização total de resíduos na produção de "alimentos funcionais". Esta é uma prática que além de evitar desperdícios, reduz o custo dos produtos.

A geração de resíduos e subprodutos é intrínseca a qualquer cadeia produtiva. Além disso, a atual produção agroindustrial em larga escala, observa-se que a difusão de conceitos como minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos é cada vez mais proeminente e necessária na promoção de processos sustentáveis, principalmente considerando a necessidade da valorização da extensa área de plantio e o potencial de produção agrícola brasileiro.

Neste sentido, a FES é vista como uma técnica proeminente na transformação de matérias-primas naturais em produtos de interesses através da ação de micro-organismos que viabilizam o aproveitamento e valorização de resíduos e subprodutos agroindustriais com a consequente redução de impactos ambientais (PRABHAKAR et al, 2005).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho dos subprodutos da agroindústria, principalmente da soja e da cana de açúcar, na esporulação de *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666, por fermentação de estado sólido, que visa o uso direto do fermentado seco e moído, como alimento probiótico.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em 04 etapas:

- a) Determinação do substrato, usando como suporte o farelo de soja;
- b) Determinação do suporte, usando como substrato o melaço de cana;
- c) Avaliação do uso de resíduos do processamento da cana como substrato, usando a casca de soja como suporte.
- d) Determinação do melhor tempo de esporulação (cinética);

- Micro-organismo

Cepa padrão do *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 liofilizada, isolada do *natto* comercial da empresa Hinode (Los Angeles, Califórnia), fornecida pelo banco de Cepas: Agricultural Research Service Culture Collection (EUA) – ARS (NRRL), mantida em refrigeração (4°C), com repiques periódicos trimestrais em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA).

- Inóculo

O inóculo foi produzido pela semeadura em tubos contendo 30,0 mL de caldo de soja tripticaseína (TSB), incubado por 18 horas a $35,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Com a biomassa aproximada de 5.10^6 UFC/ml.

- Suporte e substratos

O melaço de cana foi obtido do Grupo Moreno - Unidade de Luiz Antônio/SP-Brasil, a vinhaça de cana foi fornecida pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.

Os suportes testados, sem tratamento prévio, possuem as seguintes características:

a) Casca de soja, tamanho médio da partícula 1,85 mm, adquirida da agropecuária Murici, São José dos Pinhais - PR, 83015-290. É composta de: celulose (29–51%), hemiceluloses (10–25%), lignina (1–4%), pectinas (4–8%), proteínas (11–15%), e resíduos minerais (CASSALES et al, 2011, LIU et al., 2017).

b) Farelo de soja, tamanho da partícula 0,84-2,0 mm, obtido da empresa Imcopa, composto de ~50% de proteína e carboidratos (~30%), com níveis de 12 a 13 % de umidade (IMCOPA, 2009).

c) Mistura de casca de soja (50) % e farelo de soja (50) %, sem tratamento prévio;

- Obtenção de esporos bacterianos por fermentação em estado sólido

As fermentações foram executadas em frascos Erlenmeyer de 125,0 mL de capacidade, boca larga, tampão de algodão, onde foram adicionados 10,0 g de cada suporte testado. Os substratos foram adicionados ao suporte seco antes da esterilização (autoclavação a 121 °C por 15 minutos), seu volume foi baseado na sua capacidade máxima de retenção (2,4 mL de água/g de farelo, 3,0 mL de água/g de mistura farelo e casca, 3,6 mL de água/g de casca). O pH do substrato foi ajustado com a solução de Na(OH) 1M, após a esterilização, e verificado após a adição de todos os componentes, como descrito por SOCCOL et al. (1995).

Para a determinação da umidade foi utilizado um analisador de umidade por infravermelho (Top 60 Ray, Bel Engineering, Italy).

O volume de inóculo (3,0%) foi calculado em relação ao volume do substrato e foi adicionado ao meio já esterilizado com homogeneização vigorosa, em cabine de fluxo laminar. Posteriormente, o cultivo foi incubado em estufa, a $35,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

Para quantificação da biomassa foram retiradas amostras, com uma pinça estéril, em cinco pontos equidistantes do fermentado. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro, pesados (antes e depois da amostragem). Foram adicionados 10,0 mL de água destilada estéril com 0,01% de Tween 80, agitadas em vortex por cinco minutos e filtradas em funil com peneiras em aço inoxidável previamente esterilizada. O filtrado foi submetido ao aquecimento a 80°C por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes, armazenada a $5,0^{\circ}\text{C} \pm 3,0^{\circ}\text{C}$.

A quantificação foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em triplicata, na superfície do ágar de soja tripticaseína (TSA). Na inoculação foram utilizados 50 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a $35,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC/g massa seca⁻¹.

Na avaliação do uso de vinhaça de cana e melaço de cana como substratos alternativos ao melaço de soja, a casca de soja foi utilizada como suporte e o pH da solução de substrato foi ajustado para 7,5.

- Cinética

A cinética de produção de esporos foi realizada com a mesma metodologia já citada, porém com o diferencial do método ajuste do pH do meio. Para a obtenção de um fermentado com pH inicial de pH $7,0 \pm 0,5$ pós-esterilização, o pH do substrato foi ajustado 12,3. Este ajuste implicou em um acréscimo de Na (OH) 1M (quantificado posteriormente) em 26,66% de NaOH na quantidade de solução aquosa, evitando um ajuste posterior de pH e consequente contaminação. O pH foi verificado como descrito por Soccol et al. (1995).

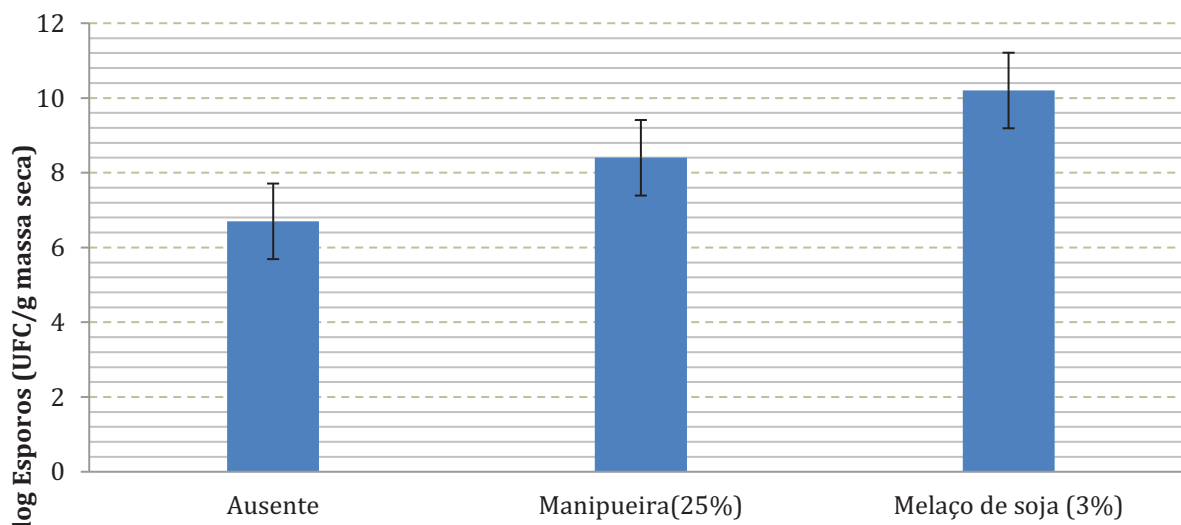
3.3 RESULTADOS

Os resultados da FES utilizando farelo de soja como suporte e diferentes substratos são apresentados na Tabela 9 e na Figura 17. O uso de melaço de soja proporcionou uma contagem de esporos maior que 1 log em relação à manipueira e maior que 2 logs em relação à ausência de substrato.

TABELA 9– ESPORULAÇÃO DE *B. subtilis var.subtilis* B-3666, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR GRAMA DE FARELO

SUBSTRATO	PRODUÇÃO DE ESPOROS (UFC/g massa seca)
Farelo e Água	$1,0 \cdot 10^5$
Farelo e Manipueira (25%)	$5,0 \cdot 10^6$
Farelo e Melaço de soja 3%	$5,0 \cdot 10^7$

FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES EM DIFERENTES SUBSTRATOS



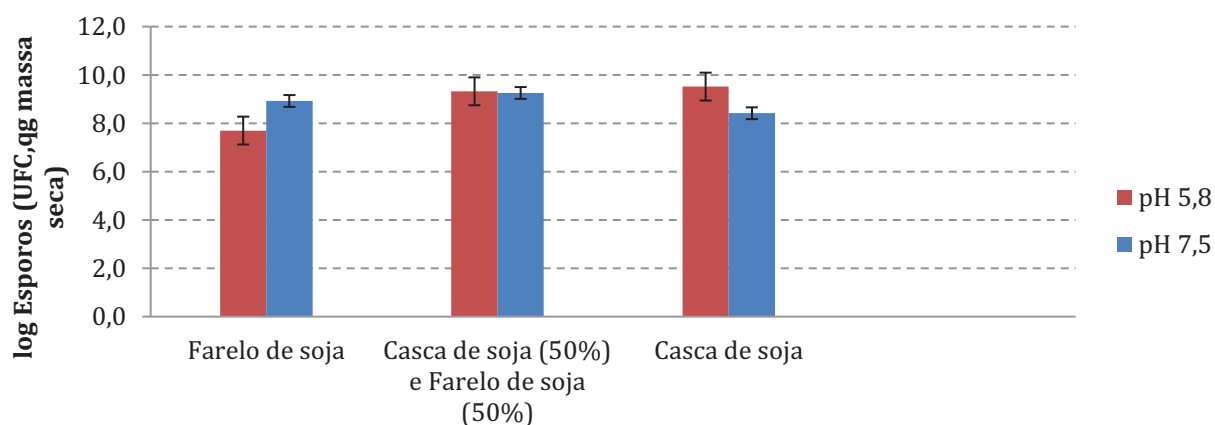
Nas condições do primeiro ensaio, pH do substrato 5,8 (não ajustado), o farelo de soja como suporte, apresentou produção de esporos cerca de dois logs inferior ao uso de casca de soja, que por sua vez apresentou resultados similares à mistura casca + farelo.

Com o pH do substrato ajustado para 7,5, não foram observadas alterações significativas quando utilizados casca de soja e farelo de soja+casca de soja como suporte, e em relação ao farelo de soja, houve uma diferença em cerca de um log a menos, como demonstrado na TABELA 10. A Figura 18 apresenta a leve tendência ao aumento da produção com o aumento do pH para o farelo de soja e a mistura casca + farelo, porém não significativa (menor que 1 log). Desta forma, ressalta-se que estudos complementares deverão ser realizados para a avaliação da influência do pH na esporulação.

TABELA 10- ESPORULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO E DIFERENTES SUPORTES, TEMPO DE INCUBAÇÃO 5 DIAS.

SUPORTE	pH do substrato 5,8	pH do substrato 7,5
	(Esporos, UFC/g massa seca).	(Esporos, UFC/g massa seca).
Farelo de soja	$5,0 \cdot 10^7$	$8,4 \cdot 10^8$
Casca de soja (50%) e Farelo de soja (50%)	$2,1 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
Casca de soja	$3,3 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^9$

FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES FRENTE A DIFERENTES SUPORTES, EM DIFERENTES pHs.



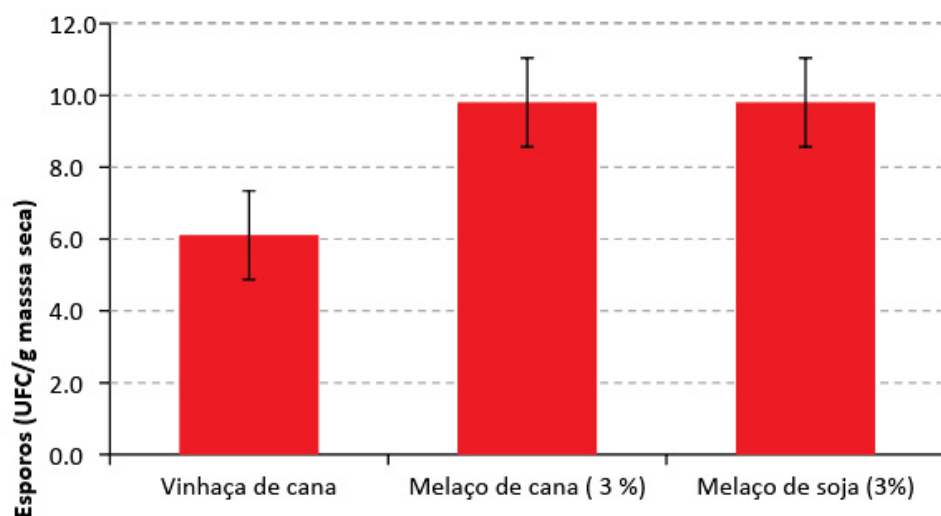
A avaliação do uso dos subprodutos do processamento da cana de açúcar foi realizada nesta quarta etapa, considerando a disponibilidade, o valor nutricional e o preço deste subproduto. A utilização do melaço de cana como substrato apresentou os resultados da produção de esporos similares à utilização do melaço de soja, enquanto a vinhaça de cana como substrato resultou em uma menor produção de esporos (TABELA 11).

O resultado é um indicativo de que tanto o melaço de soja como o melaço de cana podem ser usados na produção de altas quantidades ($\geq 10^9$) de esporos de *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666.

TABELA 11- ESPORULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS E CASCA DE SOJA COMO SUPORTE, TEMPO DE INCUBAÇÃO 5 DIAS.

Substrato	Esporos
	UFC/g massa seca
Vinhaça de cana	$1,3 \cdot 10^6$
Melaço de cana (3 %)	$6,0 \cdot 10^9$
Melaço de soja (3%)	$6,6 \cdot 10^9$

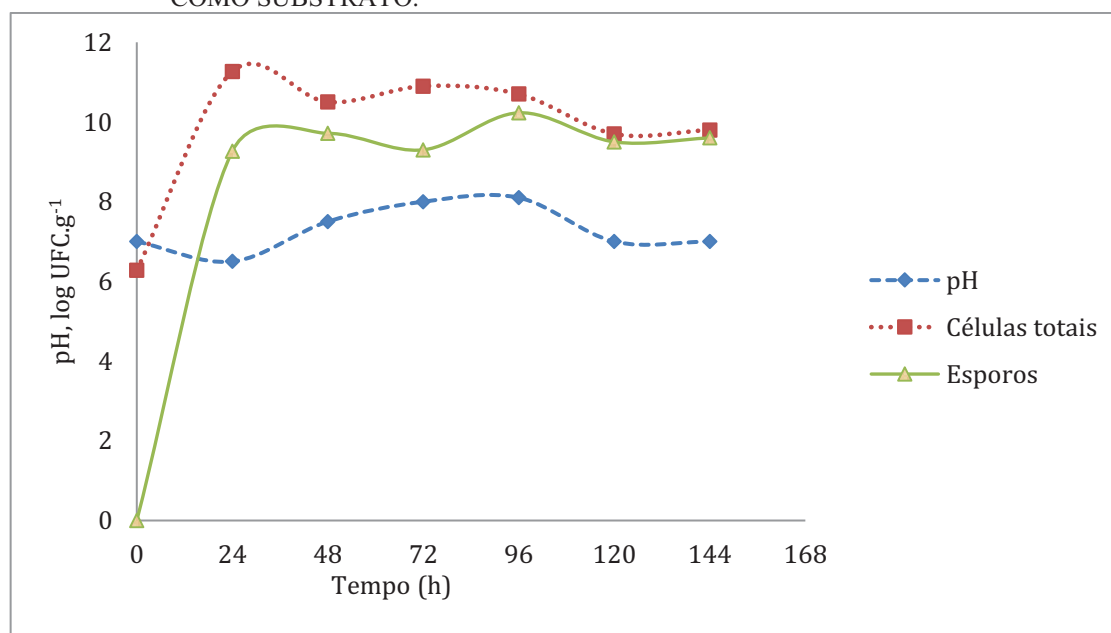
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DO USO DOS SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DA CANA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES.



A cinética do crescimento e esporulação do *B. subtilis* var. *subtilis* com a utilização de casca de soja como suporte e melaço de soja como substrato foi executada para, determinar o tempo de incubação. A Figura 20 contém as informações a respeito da produção máxima de esporos, sendo esta de $2,9 \times 10^{10}$ UFC.grama massa seca⁻¹, após 96 horas de cultivo.

Inicialmente há um decréscimo do pH coincidindo com o crescimento da biomassa, provavelmente devido à atividade fermentativa do crescimento bacteriano sobre os açúcares do melaço de soja. Após 24 horas de fermentação, há aumento do pH, seguido de um leve decréscimo após 96h.

FIGURA 20 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE CASCA DE SOJA COMO SUPORTE E MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.



3.4 DISCUSSÃO

O melaço de soja é um subproduto da indústria de processamento de soja, que não possui demanda comercial significativa. Rico em carboidratos, sua capacidade fermentativa se deve, em grande parte, à presença de vários tri e tetrassacarídeos, como rafinose e estaquiose, respectivamente (SNYDER & KWON, 1987). LI et al. (1997) demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* podem utilizar rafinose, galactose e sucrose como fontes de carbono e Stulke e Hillen (2000) citam que o *Bacillus subtilis* é capaz de utilizar numerosos carboidratos como fonte de carbono e energia, pela secreção de diferentes enzimas podem degradar os polissacarídeos presentes nas biomassas de origem vegetal.

Muitos autores citam o uso do melaço de soja como substrato para o cultivo de bactérias do gênero *Bacillus*, Ful et al. (2006) o utilizaram produção de poli-β-hidroxialcanoatos (PHA) por *Bacillus spp*, Sella et al. (. 2009.) Yangjuan et al. (2018) utilizaram com bactérias ácido lácticas para a produção de ácido láctico. Porém a não abundância comercial do melaço de soja é um fator preocupante, considerando que poucas empresas o produzem, e o processo pode posteriormente ser encarecido pela escassez de matéria-prima. Enfatizando a importância da pesquisa do uso de substratos

alternativos que apresentem produção de esporos iguais ou superiores aos valores já descritos.

A produção de esporos de *B. subtilis* por meio da FES realizadas somente com a casca ou o farelo de soja como suporte e a e obtida com a mistura casca e farelo não apresentou diferenças significativas. Embora sejam resíduos de baixo custo e grande disponibilidade, existem poucos relatos na literatura do seu uso no cultivo de *Bacillus sp.* Joo et al. (2005) descrevem a produção de proteases alcalinas por *Bacillus sp.* I-312 cultivado em farinha de soja, farinha de trigo, frutose e sais minerais, Wongputtisint et al. (2014) demonstram o fácil crescimento de *Bacillus subtilis* MR10 e TK8 utilizando a casca de soja como único substrato e a produção de peptídeos com ação antimicrobiana por *Bacillus subtilis* E20 cultivado em farelo de soja foi publicada por Cheng et al. (2017).

As desvantagens do uso do farelo de soja em relação à casca de soja estão relacionadas ao maior custo da matéria prima e a alta susceptibilidade à contaminação. O farelo de soja, necessita, logo após o recebimento, ser seco e estocado em ambiente livre de umidade pois pode ser facilmente contaminado por fungos nas etapas de manuseio e armazenamento (o farelo tem um teor de umidade (aprox. 12%), superior à casca de soja (aprox.9%). Além disso, a fermentação com farelo produz odores extremamente desagradáveis durante o processo fermentativo. Embora o farelo de soja possua uma maior qualidade nutricional em relação à casca, inclusive um maior teor proteico, sua utilização encarece o produto final e causa geração de odores indesejáveis. Estes odores ocorrem devido à liberação de aminas e amônia, o que poderá elevar custos devido à necessidade de investimento em exaustores no processo industrial. (OH et al., 2007).

Outros fatores determinantes para escolha da casca de soja como suporte são: o preço da casca do grão de soja- CGS que no mercado fica em torno de 40 a 70% do preço do farelo de soja (ZAMBOM et al., 2001); a CGS tem alto valor nutricional e alta digestibilidade para ruminantes (QUICKE et al., 1959);

O uso do melaço de cana como fonte de carbono alternativa para a produção de esporos do *Bacillus subtilis var. subtilis* era esperado. Visando selecionar componentes para a elaboração de um meio de cultivo economicamente viável, Cesare-Vidaure et al. (1997) testaram diferentes subprodutos agroindustriais como: melaço de cana (0,2-0,5%) como fonte de carbono, calda de milho (0,2- 0,5%) como fonte de nitrogênio orgânico, fosfato de potássio (0,2-0,6%), sulfato de amônio (0,2-0,6%), cloreto de cálcio (0,1-0,2%) e cloreto de sódio (0,1-0,5%) como suplementos minerais e obtiveram uma concentração de células de 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL, concluindo que o melaço de cana tem efeito

positivo no crescimento do *B. subtilis*. Luna et al. (2002) descreveram a fermentação do *B. subtilis* em um meio de cultivo com melaço de cana como um dos substratos e, respectivamente, extrato de levedura e ureia como fonte de nitrogênio. Jenilaran et al. (2015) descreveram a produção de enzimas extracelulares por *Bacillus spp.* Com a utilização de melaço com aditivos, Al Mamun et al. (2017) demonstraram o uso de melaço na produção de proteases alcalinas por *Bacillus licheniformis* e Wu et al. (2017) sintetizaram isomaltoses a partir do cultivo de *Bacillus subtilis* WB800-pHA01 com melaço de cana como substrato, num reator de membranas biológicas. Souza et al. (2014) obtiveram um incremento na produção da biomassa de *Bacillus sp.* RAB9 substituído a glicose do meio NYD por melaço de soja (aumento de 95.9%) e melaço de cana (aumento de 310.8%).

Algumas das referências do uso de *Bacillus subtilis* com melaço de cana, referem-se à produção de Triptofano (SHASALTANEH et al, 2013), fitase (ROCKY-SALIMI, 2017), 2, 3-Butanediol (DESHMUKH et al., 2015). Não foram encontradas na literatura descrições do uso de melaço de cana na produção de esporos de *Bacillus sp.* e o que se tem reportado não envolve a formulação de meio de cultivo para a produção de altos rendimentos de esporos.

O período inicial da cinética é caracterizado por uma intensa atividade fermentativa e leve decaimento do pH. Esse fato é atribuído à atividade metabólica de crescimento microbiano, que ocorre inicialmente, na qual os microrganismos utilizam os açúcares disponíveis no meio fermentescível (SARKAR et al., 1993), devido a multiplicação das células vegetativas e formação de produtos de ácidos carboxílicos, tais como lactato, piruvato e acetato. Sequencialmente até 96 horas, observa-se o aumento do pH do meio com concomitante crescimento na produção de esporos. Nos estudos do processo esporulativo em *Bacillus subtilis* é descrito que nos primeiros estágios ocorre a formação de duas enzimas extracelulares: a serina protease alcalina, e a enzima metaloprotease neutra (DANCER & MADELSTAM, 1975), sendo a serina protease, responsável pela elevação dos valores de pH do meio (KAUR et al., 2001).

Ainda neste espectro, Dancer & Madelstam (1975) relatam que as proteases são tão importantes para a continuação do ciclo esporulativo, que inibidores das proteases alcalinas são também considerados inibidores de processos esporulativos. Este aumento de pH também pode estar associado ao esgotamento das fontes de carbono e a utilização de proteínas do meio e das paredes celulares originadas da célula-mãe durante o processo de esporulação, ou seja, a reassimilação produtos acidificados e aumento do *turnover*

proteico (MANDELSTAM & WAITES, 1968). Estabelecer uma correlação da produtividade de esporos com os valores de pH é uma ferramenta extremamente útil para estudos futuros como aplicações na otimização do processo.

Embora os ensaios para avaliação do uso dos subprodutos da industrialização da soja tenham sido realizados nas mesmas condições da cinética, observa-se que, neste experimento, a produção de esporos foi 1 log superior, o que pode ser justificado pela mudança no processo de ajuste do pH do meio, que pode ter favorecido a hidrólise dos açúcares do meio fermentescível no período de autoclavação (pré-inóculo), fenômeno este que das moléculas de açúcar em moléculas menores, de melhor assimilação ao metabolismo microbiano, facilitando assim, o processo fermentativo. Convém lembrar que a própria metodologia de contagem de esporos prevê uma variação normal de 50% a 300% (USP 24, 2006).

Não é reportado na literatura pesquisas e patentes da produção de *B. subtilis var. subtilis* com a utilização de casca de soja como suporte e melaço de soja ou melaço de cana como substrato para a produção de esporos bacterianos e visando à produção de aditivo probiótico para a nutrição animal.

3.5 CONCLUSÃO

Os resíduos agrícolas podem ser usados para produzir ingredientes funcionais valiosos, como a produção de probióticos com cepas de *Bacillus sp.* por FES, como parte de uma estratégia economicamente sustentável contribuindo assim para a viabilidade do agronegócio, principalmente quando comparado ao uso tradicional de produção de esporos com meios comerciais e suplementos.

A casca de soja e o farelo de soja, bem como sua mistura, e o melaço de soja e o melaço de cana podem ser usados como suporte e substrato, respectivamente, na produção de altas quantidades ($\geq 10^9$) de esporos de *B. subtilis var subtilis* B-3666.

As desvantagens do uso do farelo de soja em relação à casca de soja é o seu maior custo, a produção de odores desagradáveis durante o processo fermentativo (que poderá levar a investimento em exaustores no processo industrial), e a suscetibilidade à contaminação (custos de secagem e armazenamento). Normalmente, a casca de soja tem sido classificada como apenas um resíduo de baixo valor, sem utilidade, do processo da indústria de soja por causa de seus baixos nutrientes utilizáveis. Este estudo apresentou

uma forma alternativa de agregar valor a esse bioproduto como suporte de produção de aditivos probióticos.

Particularmente, o melaço possui em sua composição, nutrientes relacionados ao processo esporulativo, como o cálcio (constituente da parede do esporo) e como íons manganês (sal indutor de esporulação), substituindo assim, a necessidade da suplementação com sais de esporulação, o que, por conseguinte, causaria encarecimento do meio.

Considerando que a maior disponibilidade do melaço de cana no mercado, o uso deste subproduto nos cultivos de *B. subtilis* torna-se preferencial no desenvolvimento deste bioprocessos. Sugere-se a continuidade da pesquisa com a determinação das variáveis, com efeito, estatisticamente significativos no processo, sua otimização, padronização e validação.

REFERÊNCIAS

- AL MAMUN, M. A., MIAN, M. M., SAIFUDDIN, M., KHAN, S. N., & HOQ, M. M. Optimization of fermenting medium by statistical method for production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* MZK05M9. **Journal of Applied Biology & Biotechnology** Vol, 5(6), 24-28, 2017.
- CASSALES Ana & SOUZA-CRUZ, Priscila & Rech, Rosane & Ayub, Marco. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass & Bioenergy**, 2011. 35. 10.1016/j.biombioe, 2011.
- CESARE-VIDAURRE, T., CAMPOS, E., & CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Anais do VII Mexican Congress of Biotechnology and Bioengineering**, Mexico, 1997.
- CHENG, A. C., LIN, H. L., SHIU, Y. L., TYAN, Y. C., & LIU, C. H. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, 67, 270-279, 2017.
- DANCER, B.N., MANDELSTAM, J. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriol* 121, 406–410, 1975.
- DESHMUKH, A.N., MISTRY, S.R., YEWALE, T.B., MAHAJAN, D.M., JAIN, R., N.D. Production of 2, 3-Butanediol from Sugarcane Molasses Using 14. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)**, 2015.
- FARIA FILHO, D.E.; TORRES, K.A.A.; FARIA, D.E.; CAMPOS, D.M.B.; ROSA, P.S. Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 87-95, 2006.
- JENILARANI, D. et al. Production of extra cellular enzymes by microbial strains in molasses and additives supplemented fermentation media. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 11, p. 771-775, 2015.
- JOO, HAN-SEUNG; CHANG, CHUNG-SOON. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
- IMCOPA IMPORTAÇÃO EXPORTAÇÃO E INDÚSTRIA DE ÓLEOS LTDA. Frederico José Busato Júnior. **Processo industrial de produção do farelo concentrado de soja e melaço de soja**. PI0704760-6 A2, 30 novembro 2007, 28 julho 2009.
- KAUR et al., Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2 | **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 17, 125–129, 2001.

- LI, X.; YANG, L.; YAN, P.; ZUO, F.; JIN, F. Factors regulating production of α -galactosidase from *Bacillus sp* JF2 . **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 1-4, 1997.
- LUNA, C. L; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Production of a Biocontrol Agent for Crucifers Black Root Disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p. 133-140, 2002.
- MANDELSTAM, J., & WAITES, W. M. Sporulation in *Bacillus subtilis*. The role of exoprotease. **Biochemical Journal**, 109(5), 793–801, 1968.
- OH, S.M. et al. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus sp*. **Food Science and Technology**, v.16, n.4, p. 509-514, 2007.
- PRABHAKAR, A., KRISHNAIAH, K., JANAUN, J., BONO, A., An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology** 1, 10–16, 2005.
- QUICKE, G.V.; BENTLEY, C.G.; SCOTT, H.W. et al. Digestibility of soybean hulls and flakes and the in vitro digestibility of the cellulose in various milling by-products. **Journal of Dairy Science**, v.42, p.185-190, 1959.
- ROCKY-SALIMI, K., HASHEMI, M., SAFARI, M., MOUSIVAND, M. Valorization of untreated cane molasses for enhanced phytase production by *Bacillus subtilis* K46b and its potential role in dephytinisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 97, 222–229. 2017.
- SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis var. natto*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, **Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95–104, 2002.
- SARKAR PK, COOK E, OWEN JD. *Bacillus* fermentation of Soybeans, **World Journal Microbiology Biotechnology** 9:295-299, 1993.
- SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus* ' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Appl Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.
- SHASALTANEH, M.D., MOOSAVI-NEJAD, Z., GHARAVI, S., FOOLADI, J. Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. **Iran Journal Microbiology** 5, 285–292, 2013.
- SNYDER, H.E. & KWON, T.W. *Soybean Utilization*. New York: **Van Nostrand Reinhold Co.**,1987.
- SOCCOL, C. R. ; STERTZ, S.C.; RAIMBAULT,M.; PINHEIRO, L.I. Biotransformation Of Solid Waste From Cassava Starch Production By *Rhizopus* In

Solid State Fermentation . Part I - Optimization Of The Culture Conditions And Growth Kinetics. **Braz. Arch of Biol. and Technol**, 38, 1311-1318, 1995.

SOUZA, Renata Damasio de. Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal [doi: 10.11606/T.42.2014.tde-24022015-124003]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. **Tese de Doutorado em Microbiologia**. [acesso 2018-09-07], 2014.

SUN P, WANG JQ, ZHANG HT. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**. Dec 1;93(12):5851-5, 2010.

USP 24. Chapter 55. Biological indicators resistance performance tests. In: The United States Pharmacopeia. 29rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WONGPUTTISIN, P. et al. Use of *Bacillus subtilis* isolates from towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 328-333, 2014.

WU, Lingtian et al. Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-pall in a biologic membrane reactor. **Food Chemistry**, v. 229, p. 761-768, 2017.

YANGJUAN, J., LI, X.U., MEISI, C., XIAOMIN, Z., CUIPING, H. a. N., Song, W., n.d., Lactic Acid Production by Fermentation of Soybean Molasses with Lactic Acid Bacteria and Carbohydrate Metabolism. 39, 130–134. **Food Science**, 2018.

ZAMBOM, M.A.; SANTOS, G.T.; MODESTO, E.C. et al. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p.937-943, 2001.

ZHOU, D.; ZHU, Y.-H.; ZHANG, W.; et al. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics generates Tr1 cells in weaned F4ab/acR– pigs challenged with an F4+ ETEC/VTEC/EPEC strain. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 95, 2015.

CAPÍTULO III

4. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666, POR FES COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA E MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO E FRASCO DE VIDRO COMO BIORREATOR

4.1 INTRODUÇÃO

Os esporos de *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B366 possuem importantes aplicações biotecnológicas como produtos probióticos; no entanto torna-se necessário alcançar altas densidades de células esporuladas a um custo competitivo para viabilizar a sua produção industrial.

A produção industrial de esporos é realizada principalmente por fermentação submersa, porém a fermentação em estado sólido (FES) apresenta grande potencial e ainda agrega benefícios ambientais, já que utiliza resíduos e subprodutos industriais de baixo custo.

Ferramentas estatísticas têm sido empregadas para a maximização dos resultados. A otimização de processos fermentativos pode ser realizada mudando um fator de cada vez. Neste processo, gera-se um grande número de experimentos e consequentemente maior custo, além disso, seus resultados não consideram as possíveis interações entre as variáveis do bioprocessos o que pode levar a erros de interpretação dos resultados. O planejamento experimental, baseado em fundamentos estatístico é uma ferramenta, amplamente descrita, aplicada para se chegar as condições otimizadas de um processo, minimizando custos e tempos e maximizando rendimento, produtividade e qualidade. A otimização do rendimento de processos de produção de esporos de micro-organismos do gênero *Bacillus* com a utilização de planejamento experimental já foi executada por diferentes pesquisadores, Posada Uribe et al. (2015) obtiveram um acréscimo de 17,2 vezes na produção de esporos de *B. subtilis* EA-CB0575 após a otimização do processo; Zheng et al (2017) aumentaram a produção de esporos do *Bacillus subtilis* NTGB-178 em 8,48 vezes e após a aplicação da metodologia de superfície de resposta (RSM). Ren et al. (2018) observaram um aumento de 3,4 vezes nos rendimentos de esporos de *Bacillus amyloliquefaciens* BS-20.

O objetivo deste estudo foi otimizar as condições do processo de fermentação em estado sólido, aplicando os métodos estatísticos de planejamento experimental, para aumentar a produção de esporos de *B. subtilis var. subtilis* B-3666.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

- Micro-organismo

Cepa padrão do *Bacillus subtilis var. subtilis* B-3666 liofilizada, isolada do *natto* comercial da empresa Hinode (Los Angeles, Califórnia), fornecida pelo banco de Cepas: Agricultural Research Service Culture Collection (EUA) – ARS (NRRL), mantida em refrigeração (4°C), com repiques periódicos trimestrais em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA).

- Inóculo

O inóculo foi produzido pela semeadura em tubos contendo 30,0 mL de caldo de soja tripticaseína TSB, incubado por 18 horas a $35,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Com a biomassa aproximada de $2,5 \times 10^6$ UFC/ml.

- Suporte e substratos

A casca da soja foi obtida da Agropecuária Murici, São José dos Pinhais, PR, sendo composta por: celulose (29–51%), hemicelulose (10–25%), lignina (1–4%), pectinas (4–8%), proteínas (11–15%), e resíduos minerais (CASSALES et al, 2011, LIU & LI, 2017). A casca de soja foi classificada em tamises para determinação da granulometria média da partícula (1,85 nm), sendo que nas fermentações este suporte foi utilizado em sua forma *in natura*.

O melaço de soja (~ 75°Brix) foi fornecido pela IMCOPA (Araucária-Brasil), composto de: açúcares totais, 50.8%; proteínas, 5.1%; lipídeos, 0.3%; pH, 5,8-6.1. (SELLA et al, 2009). A composição de seus açúcares é aproximadamente de 65% de mono e dissacarídeos e 35% de oligossacarídeos, principalmente rafinose, 5-7%, e estaquiose, 30-32% (AYUB et al., 2002; CEGLA et al., 2005). O melaço de cana (~82,62°Brix (20°C)): foi fornecido pelo Grupo Moreno - Unidade de Luiz

Antônio/SP-Brasil), sua composição é caracterizada por altas concentrações de sacarose. A milhocina, da usina de beneficiamento Cinderela, em Cantagalo PR.

Todos os experimentos foram executados em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, boca larga, tampão de algodão, onde foram adicionados 10,0 g da casca de soja seca. O substrato utilizado foi melaço de soja (~ 75X ° Brix) e o melaço de cana (82,62°Brix, 20°C). A solução de sais estimuladores da esporulação foi constituída de: K₂HPO₄. H₂O, 0,005%; MnSO₄. H₂O, 0,004%; CaCl₂. 6H₂O, 0,004% e MgSO₄. 7H₂O, 0,005%. O pH do substrato foi verificado após a adição de todos os componentes e corrigido de acordo com a especificação de cada experimento, como descrito por Soccol et al. (1995). Os substratos foram adicionados ao suporte seco antes da esterilização (autoclavação a 121 °C por 15 minutos). A massa de água adicionada para o ajuste da umidade inicial foi calculada pela seguinte fórmula:

$$Umidade = \frac{massa_{H_2O}}{massa_{H_2O} + massa_{seca}}$$

Para a determinação da umidade foi utilizado um analisador de umidade por infravermelho (Top 60 Ray, Bel Engineering, Italy).

O volume de inóculo foi calculado em relação ao volume do substrato e foi adicionado ao meio já esterilizado por homogeneização vigorosa, em cabine de fluxo laminar. O cultivo foi incubado em estufa, a 35,5°C ± 2,5°C.

Para quantificação da biomassa foram retiradas amostras, com uma pinça estéril, em cinco pontos equidistantes do fermentado. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro, pesados antes e depois da amostragem. Foram adicionados 10,0 mL de água destilada estéril com 0,01% de Tween 80, agitadas em vortex por cinco minutos e filtradas em funil com gase estéril. O filtrado foi submetido ao aquecimento a 80°C por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes e em seguida armazenado a 5,0°C ± 3,0°C.

A quantificação foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em triplicata, na superfície do ágar de soja tripticaseína (TSA). Na inoculação foram utilizados 50 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 35,5°C ± 2,5°C por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC.g massa seca⁻¹.

- Ensaios preliminares para a avaliação do efeito das variáveis independentes

a) Para efetuar um *screening* das variáveis que possuem influência significativa na produção de esporos foi utilizado um planejamento experimental *Plackett-Burman*. Para este estudo foram selecionadas cinco variáveis independentes e foi utilizada uma matriz de doze ensaios. Também foram realizados 03 ensaios nos pontos centrais para a observação da variabilidade das respostas e identificação de possíveis anomalias durante os experimentos.

TABELA 12- VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL *Plackett-Burman*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Melaço (g%)	0	3,0	6,0
pH do substrato	7,0	8,5	10,0
Tamanho médio da partícula (mm)	0,6	1,3	2,0
Tempo de incubação (dias)	3	5	7
Sais de esporulação (g%)	0	0,5	1,0

b) Para o estudo do efeito da concentração dos sais de esporulação, concentração de melaço de soja e pH do substrato, foram realizados dois ensaios preliminares utilizando um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR), fatorial completo 3^2 (três variáveis estudadas em dois níveis), incluindo 04 pontos axiais e três pontos centrais, num total de 17 experimentos por planejamento.

TABELA 13- NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Sais de esporulação (g%)	0,07	0,1	0,15	0,2	0,23
Melaço (%)	0,5	1,5	3,0	4,5	5,5
pH do substrato	5,8	6,5	7,5	8,5	9,2

TABELA 14 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Sais de esporulação (g%)	0	0,2	1,4	3,0	3,75
Melaço (%)	2,8	4,5	7,0	9,5	11,2
pH do substrato	0	2,0	6,0	10,0	13,7

- Otimização- Planejamento Central do tipo composto central rotacional

Para determinar as condições que maximizam a produção de esporos, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) fatorial completo 2^2 (duas variáveis estudadas em dois níveis), incluindo 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Foram analisados os efeitos das variáveis: concentração de melaço e taxa de inóculo (ainda não avaliado).

TABELA 15 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Melaço (g%)	1,8	3,0	6,0	9,0	10,2
Inóculo (%)	1,8	3,0	6,0	9,0	10,2

Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo de segunda ordem conforme a equação 1, que descreve a superfície de resposta obtida.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde y representa a variável resposta, b representa os coeficientes de regressão, e x os valores codificados para as variáveis independentes.

A validação experimental dos resultados foi feita através da repetição do ensaio em quintuplicata, nas condições ótimas estabelecidas.

- Cinética

Foi realizada para acompanhamento dos parâmetros de produção de esporos, pH, e umidade do meio, bem como para a determinação do melhor tempo de incubação. A cinética foi realizada com os parâmetros do processo otimizado. O pH da solução de substrato é ajustado entre 12,0 e 12,4 (antes de ser misturado com o suporte); Calcula-se que este ajuste seja equivalente a um percentual da solução de Na (OH) 1M nos valores de 25 a 30% da solução aquosa final. Embora a solução de substrato pareça ter um alto valor de basicidade, ao ser misturada com a casca de soja e passar pelo processo de autoclavação, obtém-se um valor inicial de cultivo na faixa de de 7,0 a 7,6, com umidade de 65%.

- Avaliação da adição de fontes adicionais de nitrogênio

A FES foi executada nas condições ótimas estabelecidas para cada melaço estudado, sendo adicionadas ao substrato as seguintes fontes de nitrogênio, na concentração de 0,3 g%: extrato de levedura, glutamato e milhocina (*corn steep liquor*).

- Análise estatística

O planejamento fatorial experimental e a análise estatística dos resultados foram feitos através do uso do programa Statistic 8.0 (Statsoft, Inc.).

4.3 RESULTADOS

- Melaço de soja

Os resultados obtidos no *screening* das variáveis que possuem influência significativa na produção de esporos estão demonstrados nas Tabelas 16, 17 e na Figura 21.

TABELA 16 - AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR PB (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL *Plackett Burman*) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.

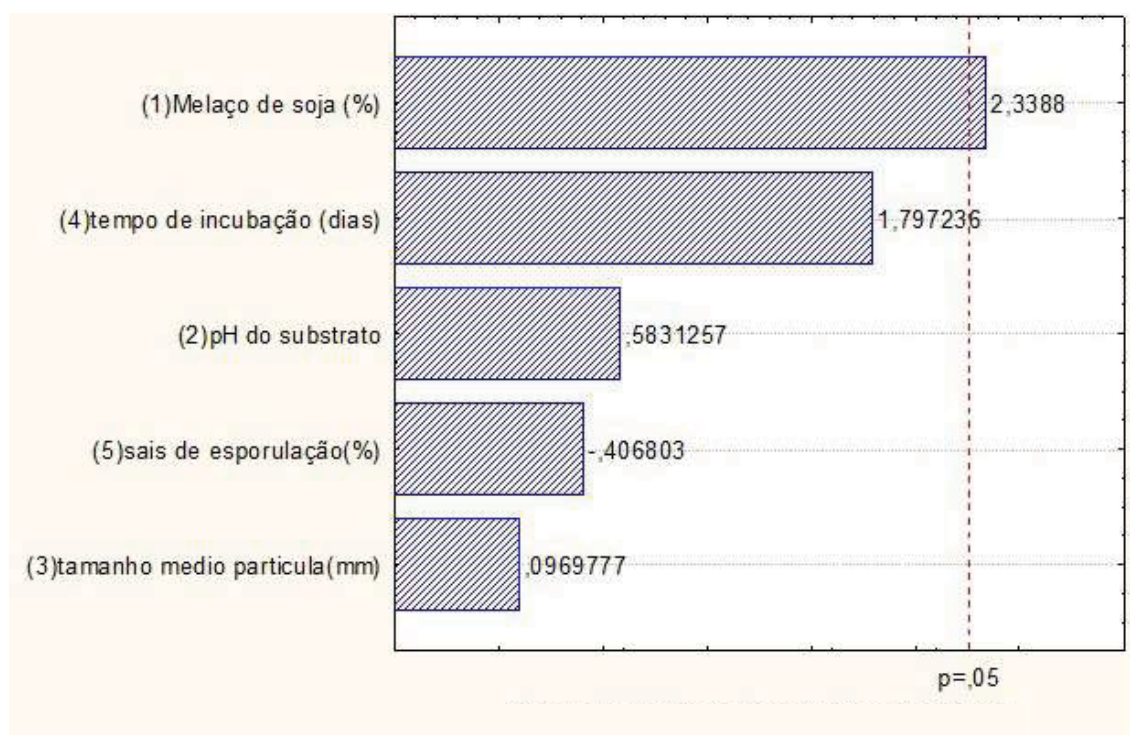
Ensaio	Melaço de soja (%)	pH do substrato	Tamanho médio da partícula (mm)	Tempo de incubação (dias)	Sais de esporulação (%)	Esporos (UFC/g de massa seca)
1	6,0	7,0	2,0	3	0	$1,5 \cdot 10^{11}$
2	6,0	10,0	0,6	7	0	$5,7 \cdot 10^{11}$
3	0	10,0	2,0	3	1,0	$5,7 \cdot 10^{10}$
4	6,0	7,0	2,0	7	0	$6,4 \cdot 10^{11}$
5	6,0	10,0	0,6	7	1	$3,9 \cdot 10^{10}$
6	6,0	10,0	2,0	3	1,0	$9,4 \cdot 10^{10}$
7	0	10,0	2,0	7	0	$2,8 \cdot 10^{11}$
8	0	7,0	2,0	7	1	$1,2 \cdot 10^{11}$
9	0	7,0	0,6	7	1	$9,2 \cdot 10^{10}$
10	6,0	7,0	0,6	3	1	$1,6 \cdot 10^{10}$
11	0	10,0	0,6	3	0	$1,9 \cdot 10^{10}$
12	0	7,0	0,6	3	0	$4,4 \cdot 10^{10}$
13 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$2,3 \cdot 10^{11}$
14 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$6,9 \cdot 10^{11}$
15 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$5,0 \cdot 10^{10}$

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta produção de esporos estão descritos na Tabela 17, onde se observa que o coeficiente de correlação não foi satisfatório, explicando apenas 50,0% da variância com um coeficiente de correlação de 0,50, a um nível de confiança de 95%. Deste modo, pode-se afirmar que o referido modelo não apresentou significância estatística e que o mesmo não pode ser utilizado para fins preditivos. O diagrama de pareto dos resultados é apresentado na Figura 21.

TABELA 17 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PB (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL *Plackett Burman*) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
Melaço de soja	$6,6 \cdot 10^{22}$	1	$6,6 \cdot 10^{22}$	1,543	0,246
pH	$4,7 \cdot 10^{17}$	1	$4,7 \cdot 10^{17}$	0,000	0,997
Tamanho médio da partícula	$2,6 \cdot 10^{22}$	1	$2,6 \cdot 10^{22}$	0,609	0,455
Tempo de incubação	$1,5 \cdot 10^{23}$	1	$1,5 \cdot 10^{23}$	3,580	0,091
Sais de esporulação	$1,4 \cdot 10^{23}$	1	$1,4 \cdot 10^{23}$	3,188	0,108
Erro	$3,8 \cdot 10^{23}$	9	$4,3 \cdot 10^{22}$		
Total	$7,6 \cdot 10^{23}$	14			
R ² = 0,50					

FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO DOS RESULTADOS PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.



Nenhuma das variáveis, nas condições estudadas apresentou efeito estatisticamente significativo.

Os resultados do primeiro DCCR para o estudo do efeito da concentração dos sais de esporulação, concentração de melaço de soja e pH do substrato, estão demonstrados nas Tabelas 18 e 19, e na Figura 22.

TABELA 18 - MATRIZ DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) E RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

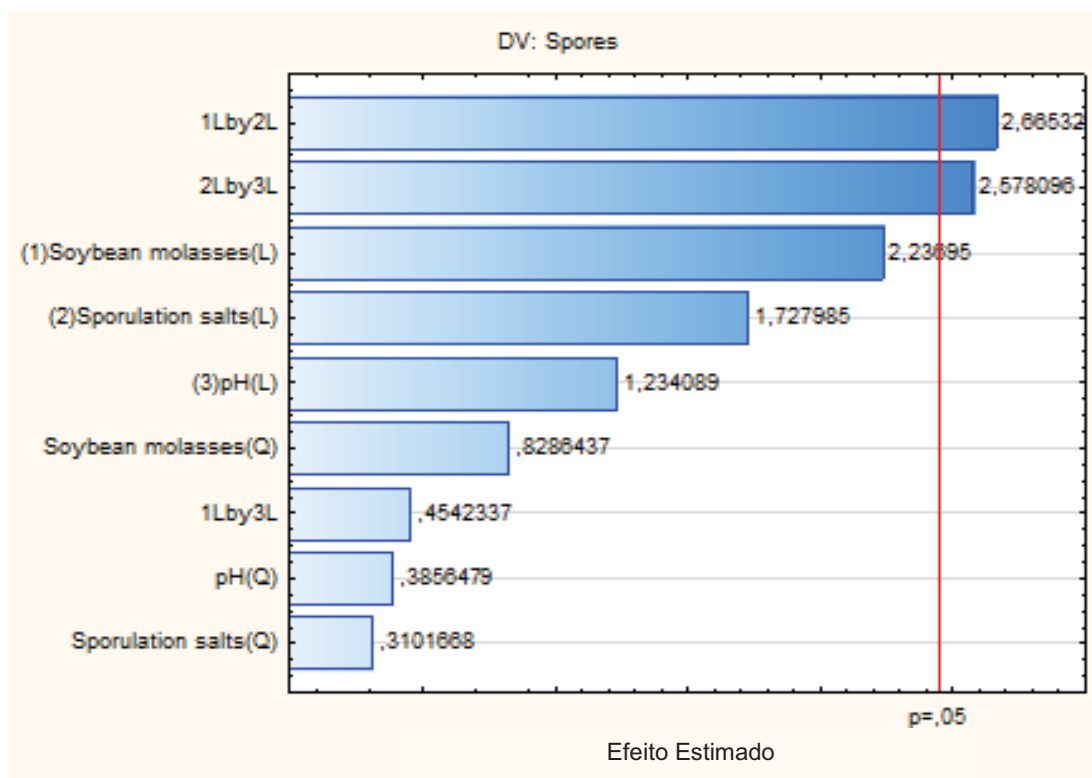
Ensaio	Melaço de soja (%)	Sais de Esporulação (%)	pH	Esporos (UFC/g massa seca)
1	1,5	0,1	6,5	$1,4 \cdot 10^{10}$
2	1,5	0,1	8,5	$1,1 \cdot 10^{10}$
3	1,5	0,2	6,5	$2,0 \cdot 10^8$
4	1,5	0,2	8,5	$1,9 \cdot 10^{10}$
5	4,5	0,1	6,5	$1,2 \cdot 10^{10}$
6	4,5	0,1	8,5	$1,0 \cdot 10^{10}$
7	4,5	0,2	6,5	$2,1 \cdot 10^{10}$
8	4,5	0,2	8,5	$4,8 \cdot 10^{10}$
9	0,5	0,2	7,5	$1,2 \cdot 10^{10}$
10	5,5	0,2	7,5	$1,9 \cdot 10^{10}$
11	3,0	0,07	7,5	$1,0 \cdot 10^{10}$
12	3,0	0,23	7,5	$1,4 \cdot 10^{10}$
13	3,0	0,15	5,8	$1,5 \cdot 10^{10}$
14	3,0	0,15	9,2	$1,0 \cdot 10^{10}$
15 (PC)	3,0	0,15	7,5	$1,1 \cdot 10^{10}$
16(PC)	3,0	0,15	7,5	$1,4 \cdot 10^{10}$
17(PC)	3,0	0,15	7,5	$1,3 \cdot 10^{10}$

TABELA 19 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PRIMEIRO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1) Melaço de soja (L)	$2,4 \cdot 10^{20}$	1	$2,4 \cdot 10^{20}$	5,839	0,046
Melaço de soja (Q)	$3,8 \cdot 10^{19}$	1	$3,8 \cdot 10^{19}$	0,928	0,368
(2) Sais de esporulação (L)	$1,4 \cdot 10^{20}$	1	$1,4 \cdot 10^{20}$	3,484	0,104
Sais de esporulação (Q)	$4,9 \cdot 10^{18}$	1	$4,9 \cdot 10^{18}$	0,119	0,740
(3) pH (L)	$7,2 \cdot 10^{19}$	1	$7,2 \cdot 10^{19}$	1,780	0,224
pH (Q)	$8,0 \cdot 10^{18}$	1	$8,0 \cdot 10^{18}$	0,196	0,671
1L / 2L	$3,4 \cdot 10^{20}$	1	$3,4 \cdot 10^{20}$	8,290	0,024
1L / 3L	$9,8 \cdot 10^{18}$	1	$9,8 \cdot 10^{18}$	0,241	0,639
2L / 3L	$3,2 \cdot 10^{20}$	1	$3,2 \cdot 10^{20}$	7,756	0,027
Erro	$2,8 \cdot 10^{20}$	7	$4,1 \cdot 10^{19}$		
Total	$1,4 \cdot 10^{21}$	15			

$R^2 = 0,80$

FIGURA 22 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR



Os efeitos significativos observados foram a concentração do melaço de soja, a interação positiva entre melaço de soja e sais de esporulação, a interação positiva entre sais de esporulação e pH. Os resultados indicam a necessidade de trabalharmos numa faixa mais alta em todas as variáveis.

Os resultados do segundo DCCR com faixas de estudo ampliadas para a avaliação do efeito da concentração dos sais de esporulação, concentração de melaço de soja e pH do substrato, estão apresentados nas Tabela 20 e na Figura 23.

TABELA 20 - RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) - NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

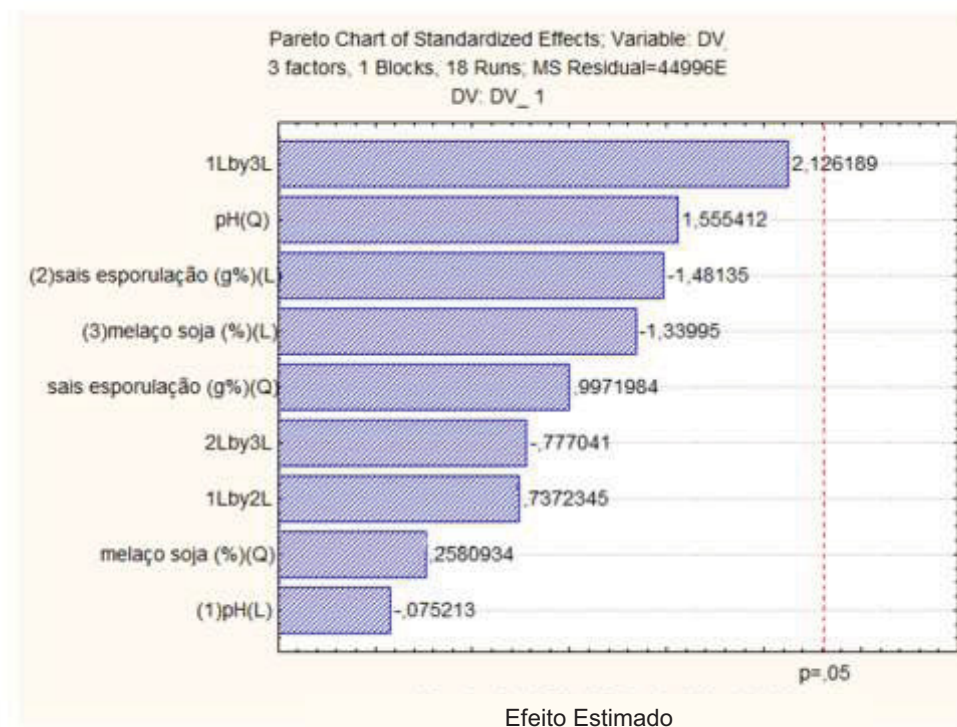
ENSAIO	pH	Sais de esporulação (g%)	Melaço de soja (g%)	Esporos (UFC/grama de massa seca)
1	4,5	0,2	2,0	$2,9.10^{10}$
2	4,5	0,2	10,0	$1,3.10^{10}$
3	4,5	3,0	2,0	$1,7.10^{10}$
4	4,5	3,0	10,0	$4,1.10^6$
5	9,5	0,2	2,0	$8,1.10^9$
6	9,5	0,2	10,0	$1,8.10^{10}$
7	9,5	3,0	2,0	$9,7.10^9$
8	2,8	3,0	10,0	$7,8.10^9$
9	11,2	1,4	6,0	$5,4.10^9$
10	7,0	1,4	6,0	$1,3.10^{10}$
11	7,0	0	6,0	$9,6.10^9$
12	7,0	3,75	6,0	$3,6.10^9$
13	7,0	1,4	0	$4,3.10^9$
14	7,0	1,4	13,7	$6,3.10^5$
15 (PC)	7,0	1,4	6,0	$7,6.10^9$
16 (PC)	7,0	1,4	6,0	$1,3.10^9$
17 (PC)	7,0	1,4	6,0	$1,1.10^9$

TABELA 21 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO SEGUNDO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1) pH (L)	$2,6.10^{17}$	1	$2,6.10^{17}$	0,008	0,933
pH (Q)	$6,9.10^{19}$	1	$6,9.10^{19}$	2,025	0,198
(2) Sais de esporulação (L)	$1,8.10^{20}$	1	$1,8.10^{20}$	5,305	0,055
Sais de esporulação (Q)	$9,8.10^{19}$	1	$9,8.10^{19}$	2,860	0,135
(3) Melaço de soja (L)	$8,5.10^{19}$	1	$8,5.10^{19}$	2,470	0,160
Melaço de soja (Q)	$4,4.10^{17}$	1	$4,4.10^{17}$	0,013	0,913
1L / 2L	$2,4.10^{19}$	1	$2,4.10^{19}$	0,713	0,426
1L / 3L	$2,0.10^{20}$	1	$2,0.10^{20}$	5,930	0,045
2L / 3L	$2,7.10^{19}$	1	$2,7.10^{19}$	0,776	0,408
Erro	$2,4.10^{20}$	8	$3,4.10^{19}$		
Total	$8,5.10^{20}$	17			

$R^2 = 0,72$

FIGURA 23 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DE ESPORULAÇÃO, CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA E pH DO SUBSTRATO.



O único efeito significativo observado foi a interação positiva entre melaço de soja e o pH. Não houve nenhum efeito significativo linear, sendo o mais próximo ($p = 0,055$) e negativo, a concentração de sais de esporulação. Com base na análise dos dados obtidos, observação do processo, testes anteriores e revisão da literatura, optou-se pela manutenção das seguintes variáveis nos respectivos valores: pH, $7,0 \pm 0,5$; sais de esporulação, zero; tempo de incubação, 5 dias e tamanho médio da partícula 1,6 mm.

Na determinação das condições que maximizam a produção de esporos, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional fatorial (DCCR) com duas variáveis: concentração de melaço de soja e a taxa de inóculo. As tabelas 22 e 23 contém as informações sobre o delineamento experimental e os resultados obtidos.

TABELA 22 -RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES

Ensaio	Melaço de soja (%)	Taxa de Inóculo (%)	Esporos (UFC/g massa seca)
1	3	3	$3,7.10^9$
2	3	9	$2,8.10^{10}$
3	9	3	$9,8.10^9$
4	9	9	$8,4.10^9$
5	1,8	6	$9,9.10^9$
6	10,2	6	$6,1.10^9$
7	6	1,8	$2,8.10^{10}$
8	6	10,2	$3,1.10^{10}$
9 (PC)	6	6	$1,8.10^{10}$
10(PC)	6	6	$1,7.10^{10}$
11(PC)	6	6	$1,4.10^{10}$

A análise dos dados das Tabela 23 e a Figura 24 demonstra que a taxa de inóculo e a concentração de melaço, na faixa utilizada não apresentaram efeito estatisticamente significativo na função linear. A taxa de inóculo foi a variável que apresentou efeito (positivo) mais próximo do significativo ($p=0,083$). A Análise de Variância (ANOVA) para a variável produção de esporos demonstra que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,96 com uma percentagem de variância explicada de 0,86, com 95% de confiança, mostrando que o modelo foi bem ajustado para esta variável, sendo este estatisticamente significativo. Considerando que o modelo quadrático foi validado para a variável o mesmo foi usado para gerar as superfícies de resposta, (Figura 25) tendo o objetivo de otimizar o processo e demonstrar a interação entre as variáveis estudadas.

TABELA 23 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DA OTIMIZAÇÃO POR DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, COM MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	Valor de p
(1) Melaço de Soja (L)	$4,5.10^{19}$	1	$4,5.10^{19}$	1,708	0,248
Melaço de Soja (Q)	$2,1.10^{20}$	1	$2,1.10^{20}$	8,181	0,036
(2) Inóculo (L)	$9,3.10^{19}$	1	$9,3.10^{19}$	3,540	0,119
Inóculo (Q)	$1,2.10^{20}$	1	$1,2.10^{20}$	4,686	0,083
1L / 2L	$1,7.10^{20}$	1	$1,7.10^{20}$	6,305	0,054
Erro	$1,3.10^{20}$	5	$2,6.10^{19}$		
Total	$9,0.10^{20}$	10			

$R^2=0,86$

FIGURA 24 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR DCCR A 95% DE CONFIANÇA.

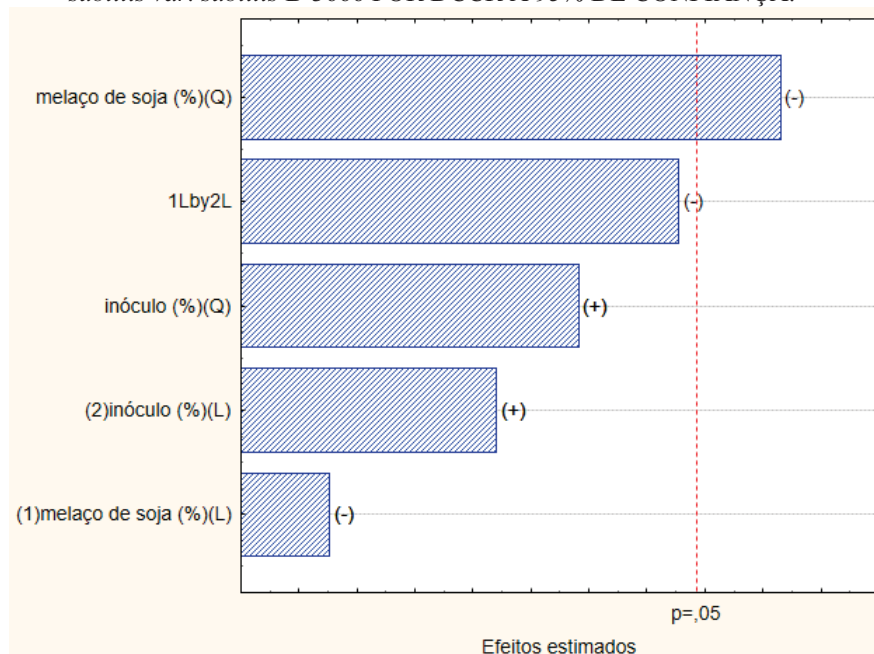
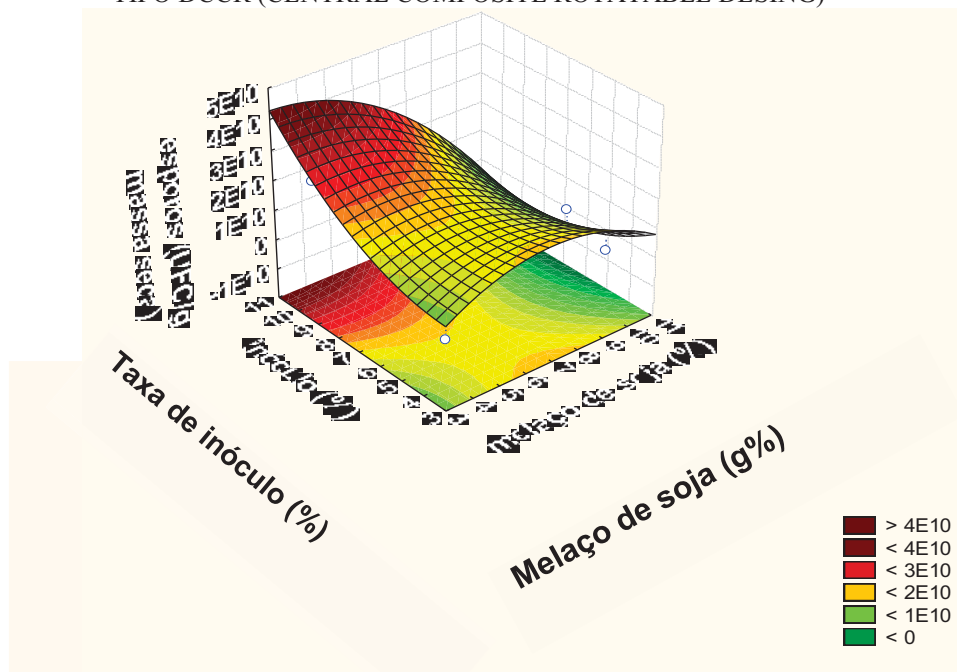


FIGURA 25 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING)



O modelo com as variáveis codificadas que representa a produção de esporos (UFC/g), em função da % do inóculo e quantidade de melaço de soja (g%), na faixa estudada, está demonstrado pela equação polinomial de segunda ordem abaixo:

$$Z = -16780104712,041 + 11816387366,2 \cdot x - 693761797,91287 \cdot x^2 - 876803041,2758 \cdot y + 525059063,76513 \cdot y^2 - 713888888,88889 \cdot x \cdot y + 0,$$

ou

$$z = 1,7 \cdot 10^{10} + 1,2 \cdot 10^{10} x + 6,9 \cdot 10^8 x^2 - 8,7 \cdot 10^8 y + 5,3 \cdot 10^8 y^2 - 7,1 \cdot 10^8 x y + 0$$

Sendo: z= esporos (UFC/g), x= inóculo (%) e y= melaço de soja (g%)

O modelo estatístico foi validado pela condução da FES em condições ideais e determinando a produção de esporos. Os resultados destes experimentos encontram-se na Tabela 24.

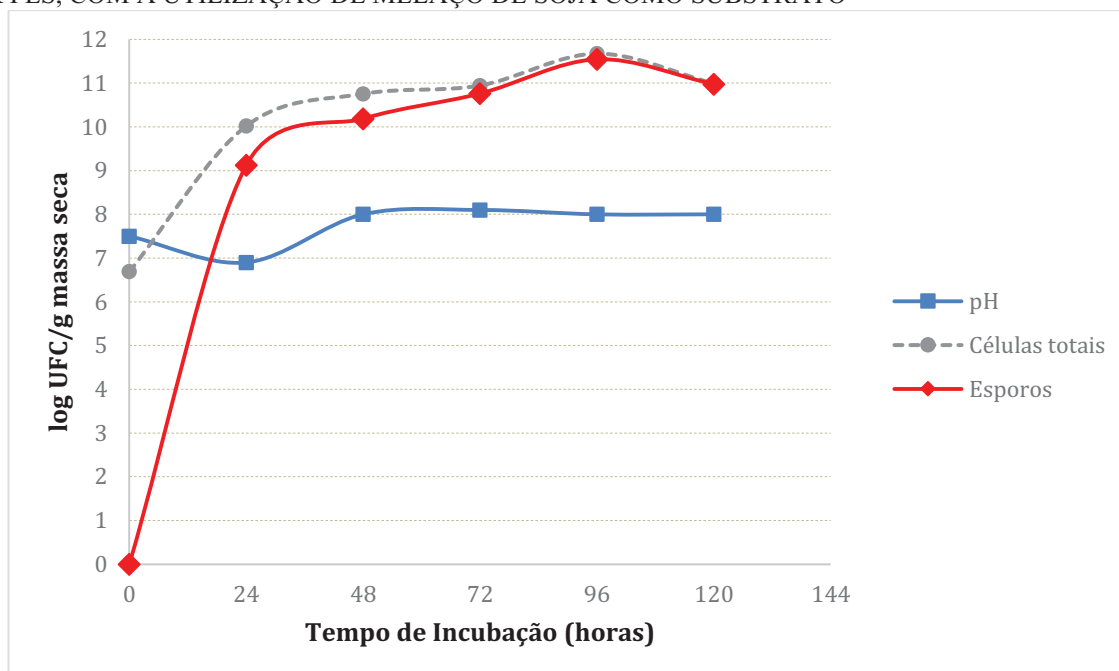
TABELA 24 –VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO.

Melaço de soja (y)	Inóculo (x)	Valor Previsto (Esporos,UFC/g) (massa seca)	Valor validado (Esporos,UFC/g massa seca)
3,0 g%	12,0%	5,2 .10 ¹⁰	9,8 .10 ¹¹
6,0 g%	12,0%	4,3 .10 ¹⁰	3,5 .10 ¹¹
3,0 g%	20,0%	1,7 .10 ¹⁰	1,6 .10 ¹¹

Não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a utilização de melaço de soja a 3 % a 6%, e inóculo de 12 e 20%. Optou pela menor concentração de ambas variáveis considerando os custos.

A cinética do crescimento e esporulação do processo otimizado foi executada para, principalmente, confirmação dos resultados obtidos e determinação do tempo de incubação ótimo. Na Figura 26 é apresentado que produção máxima de esporos foi de 3,5.10¹¹ UFC.grama massa seca⁻¹ e ocorreu após 96 horas de cultivo. Inicialmente há um decréscimo do pH coincidindo com o crescimento da biomassa, provavelmente devido à atividade fermentativa do crescimento bacteriano sobre os açúcares do melaço de soja. Após 24 horas de fermentação, há aumento do pH.

FIGURA 26- CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

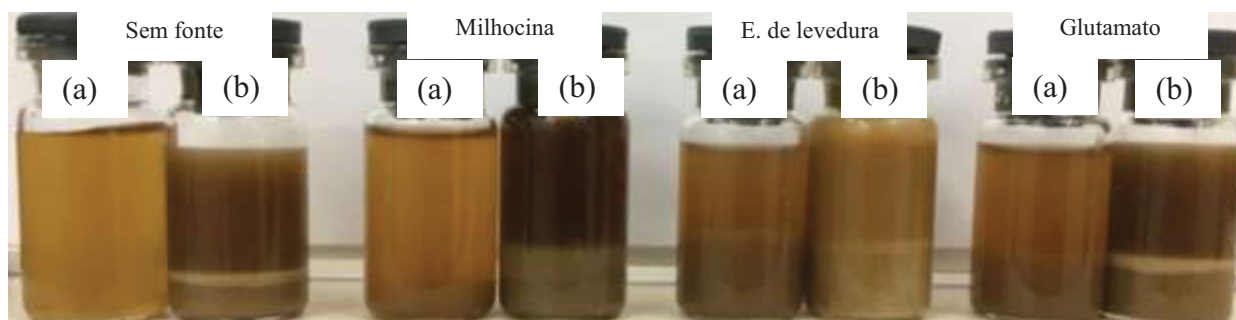


A adição de fontes complementares de Nitrogênio ao processo otimizado resultou em um acréscimo de 2 logs na produção de esporos, após a adição de extrato de levedura ou glutamato (Tabela 25). A fonte de nitrogênio que apresentou maior produtividade foi o extrato de levedura (que possui 10,0% de nitrogênio total e 5,0% de Nitrogênio α -Amino) seguido do Glutamato. Os filtrados dos fermentados são apresentados na Figura 22.

TABELA 25 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO AO PROCESSO OTIMIZADO

FONTE DE NITROGÊNIO	ESPOROS (UFC/g de massa seca)
Ausente	$3,5.10^{11}$
Extrato de levedura	$9,7.10^{13}$
Milhocina (<i>corn steep liquor</i>)	$2,5.10^{11}$
Glutamato	$3,5.10^{13}$

FIGURA 27 - FILTRADOS DAS FERMENTAÇÕES DAS FONTES DE NITROGÊNIO (3%), COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE SOJA 3%, INÓCULO 12% (OBTIDOS DA FÓRMULA DE OTIMIZAÇÃO) E CASCA DE SOJA COMO SUPORTE. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, TEM-SE: SEM FONTE (A)(B), MILHOCINA (A)(B), EXTRATO DE LEVEDURA (A)(B), E GLUTAMATO (A)(B).



FONTE: O autor (2018)

Frascos A sem ajuste do substrato, de forma comparativa e frascos B, com ajuste inicial de $7,0 \pm 0,5$ no substrato inicial.

O Quadro 8 contém as informações resumidas referentes às condições ótimas das variáveis estudadas do processo de produção de esporos de *B. subtilis* B-3666, para a obtenção de 10^{13} esporos/g de massa seca e no Quadro 9 encontram-se resumidas todas as etapas executadas para a otimização deste processo.

QUADRO 7 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Variável	Condições ótimas
Melaço de soja	3,0 g%
Inóculo	12,0%
pH do substrato	$7,0 \pm 0,5$
Sais de esporulação	ausente
Suporte	Casca de soja
Tamanho da partícula do suporte	1,2 a 2,0 mm
Umidade do suporte substrato (pré-esterilização)	$82 \pm 4\%$
Umidade inicial do fermentado (pós-esterilização)	$70 \pm 5\%$
Tempo de incubação	5 dias
Fonte de N- Extrato de levedura	3,0 g%

Obs; fermentação realizada em Frasco Erlenmeyer 125 ml, com a utilização de 10g de suporte e incubada a temperatura de $36 \pm 1,0^\circ \text{C}$

QUADRO 8 - DESCRIÇÃO SUMÁRIA DOS ENSAIOS REALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Ensaio	Melaço de soja (%)	pH	Sais de espor. (g%)	Tamanho médio partícula	Taxa de inóculo (%)	Tempo de incubação (dias)	Melhor Resultado	Efeitos significativos	R ²	obs
1-PB*	0-6,0	7-10	0-1,0	0,6-2,0	3,0	3 - 7	1,5.10 ¹¹	Nenhum	0,5	Resultados indicativos, baixo R ²
3-DCCR*	1,5-4,5	6,5-8,5	0,1-0,2	1,6	3,0	5	4,8.10 ¹⁰	Melaço de soja (+) Melaço x sais (+) Sais x pH (+)	0,80	Indicativo do uso de maiores valores para as variáveis
3-DCCR*	2,0-10,0	4,5-9,5	0,2-0,3	1,6	3,0	5	2,9. 10 ¹⁰	pH x melaço(+)	0,72	Indicativo de menor faixa para sais de esporulação e para o melaço, consequentemente para o pH
4 – Otimização DCCR	3,0-6,0	7,0	0	1,6	3,0-6,0	5	3,1. 10 ¹⁰	Melaço x melaço	0,86	Fórmula para otimização determinada
5- Validação da fórmula	3,0	7,0	0	1,6	12 e 20	5	9,8. 10 ¹¹	-	na	Melaço 3,0% Inóculo 12%
6-Cinética	3,0	7,0	0	1,6	12	Até 7 dias	3,5. 10 ¹¹	-	na	Tempo de incubação: 5 dias
7 – Adição de Fontes de nitrogênio	3,0	7,0	0	1,6	12	5	9,7 x 10 ¹³	na	na	Extrato de levedura

* Ensaio preliminares

- Melaço de cana

Os resultados obtidos no *screening* das variáveis que possuem influência significativa na produção de esporos estão demonstrados nas Tabelas 26 e 27 e na Figura 28.

TABELA 26 – AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO

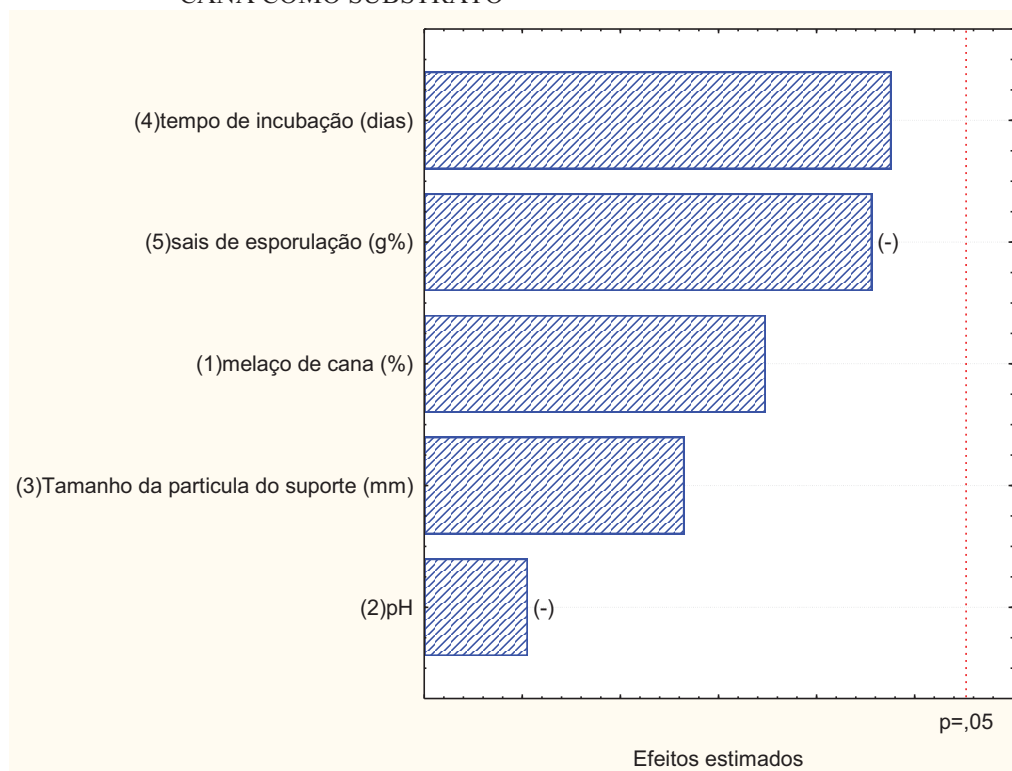
Ensaio	Melaço de soja (%)	pH do substrato	Tamanho médio da partícula (mm)	Tempo de incubação (dias)	Sais de esporulação (%)	Esporos (UFC/g de massa seca)
1	6,0	7,0	2,0	3	0	$3,3.10^{10}$
2	6,0	10,0	0,6	7	0	$1,2.10^{11}$
3	0	10,0	2,0	3	1,0	$1,3.10^{10}$
4	6,0	7,0	2,0	7	0	$1,4.10^{11}$
5	6,0	10,0	0,6	7	1	$8,6.10^9$
6	6,0	10,0	2,0	3	1,0	$2,1.10^{10}$
7	0	10,0	2,0	7	0	$6,1.10^{10}$
8	0	7,0	2,0	7	1	$2,6.10^{10}$
9	0	7,0	0,6	7	1	$2,0.10^{10}$
10	6,0	7,0	0,6	3	1	$3,4.10^9$
11	0	10,0	0,6	3	0	$4,2.10^9$
12	0	7,0	0,6	3	0	$9,8.10^9$
13 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$5,2.10^{10}$
14 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$1,5.10^{11}$
15 (PC)	3,0	8,5	1,3	5	0,5	$1,1.10^{10}$

TABELA 27– ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1) Melaço de cana	$3,1.10^{21}$	1	$3,1.10^{21}$	1,538	0,246
(2) pH do substrato	$1,6.10^{18}$	1	$1,6.10^{18}$	0,001	0,978
(3) Tamanho médio da partícula	$1,4.10^{21}$	1	$1,4.10^{21}$	0,684	0,430
(4) Tempo de incubação	$7,1.10^{21}$	1	$7,1.10^{21}$	3,539	0,093
(5) Sais de esporulação	$6,3.10^{21}$	1	$6,3.10^{21}$	3,179	0,108
Erro	$1,8.10^{22}$	9	$2,0.10^{21}$		
Total	$3,60.10^{22}$	14			

$R^2 = 0,50$

FIGURA 28 - DIAGRAMA DE PARETO DOS RESULTADOS PB (PLACKET E BURMAN DESIGN) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO



Os resultados do primeiro DCCR para o estudo do efeito da concentração dos sais de esporulação, concentração de melaço de cana e pH do substrato, são apresentados nas Tabelas 28 e 29, e na Figura 29.

TABELA 28 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.

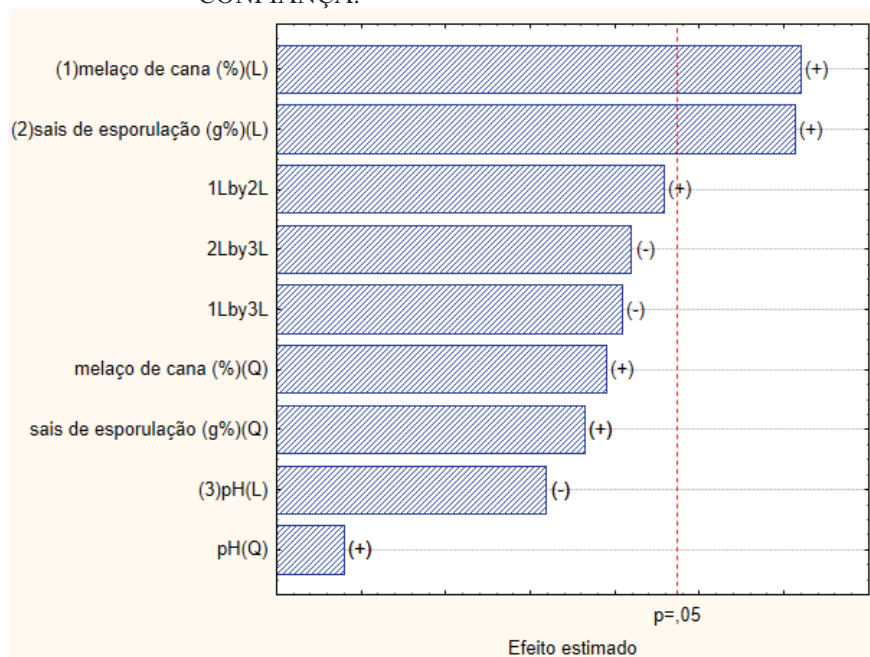
Ensaio	Melaço de cana (%)	Sais de Esporulação (%)	pH	Esporos (UFC/g massa seca)
1	1,5	0,1	6,5	$6,3 \cdot 10^9$
2	1,5	0,1	8,5	$8,4 \cdot 10^9$
3	1,5	0,2	6,5	$1,2 \cdot 10^9$
4	1,5	0,2	8,5	$4,6 \cdot 10^9$
5	4,5	0,1	6,5	$6,6 \cdot 10^9$
6	4,5	0,1	8,5	$1,1 \cdot 10^{10}$
7	4,5	0,2	6,5	$6,5 \cdot 10^{10}$
8	4,5	0,2	8,5	$8,4 \cdot 10^9$
9	0,5	0,2	7,5	$8,8 \cdot 10^9$
10	5,5	0,2	7,5	$3,5 \cdot 10^{10}$
11	3,0	0,07	7,5	$1,2 \cdot 10^9$
12	3,0	0,23	7,5	$4,1 \cdot 10^{10}$
13	3,0	0,15	5,8	$1,3 \cdot 10^{10}$
14	3,0	0,15	9,2	$5,3 \cdot 10^9$
15 (PC)	3,0	0,15	7,5	$3,0 \cdot 10^9$
16(PC)	3,0	0,15	7,5	$2,8 \cdot 10^9$
17(PC)	3,0	0,15	7,5	$2,9 \cdot 10^9$

TABELA 29 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO PRIMEIRO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1) Melaço de cana (L)	$9,6 \cdot 10^{20}$	1	$9,6 \cdot 10^{20}$	9,627	0,017
Melaço de cana (Q)	$3,8 \cdot 10^{19}$	1	$3,8 \cdot 10^{19}$	3,810	0,092
(2) Sais de esporulação (L)	$9,4 \cdot 10^{20}$	1	$9,4 \cdot 10^{20}$	9,404	0,018
Sais de esporulação (Q)	$3,3 \cdot 10^{20}$	1	$3,3 \cdot 10^{20}$	3,316	0,111
(3) pH (L)	$2,5 \cdot 10^{20}$	1	$2,5 \cdot 10^{20}$	2,549	0,154
pH (Q)	$1,6 \cdot 10^{19}$	1	$1,6 \cdot 10^{19}$	0,157	0,704
1L / 2L	$5,2 \cdot 10^{20}$	1	$5,2 \cdot 10^{20}$	5,248	0,056
1L / 3L	$4,2 \cdot 10^{20}$	1	$4,2 \cdot 10^{20}$	4,174	0,08
2L / 3L	$4,4 \cdot 10^{20}$	1	$4,4 \cdot 10^{20}$	4,408	0,074
Erro	$7,0 \cdot 10^{20}$	7	$1,0 \cdot 10^{18}$		
Total	4,84 +21	16			

$R^2 = 0,80$

FIGURA 29 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA.



Os efeitos significativos observados foram a concentração do melaço de cana e a concentração de sais de esporulação, ambos positivos. Os resultados indicaram a necessidade de trabalharmos numa faixa mais alta em todas as variáveis.

Os resultados do segundo DCCR com faixas de estudo ampliadas para a avaliação do efeito da concentração dos sais de esporulação, concentração de melaço de cana e pH do substrato, são apresentados nas Tabelas 30 e 31, e na Figura 30.

TABELA 30 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESIGN)- NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.

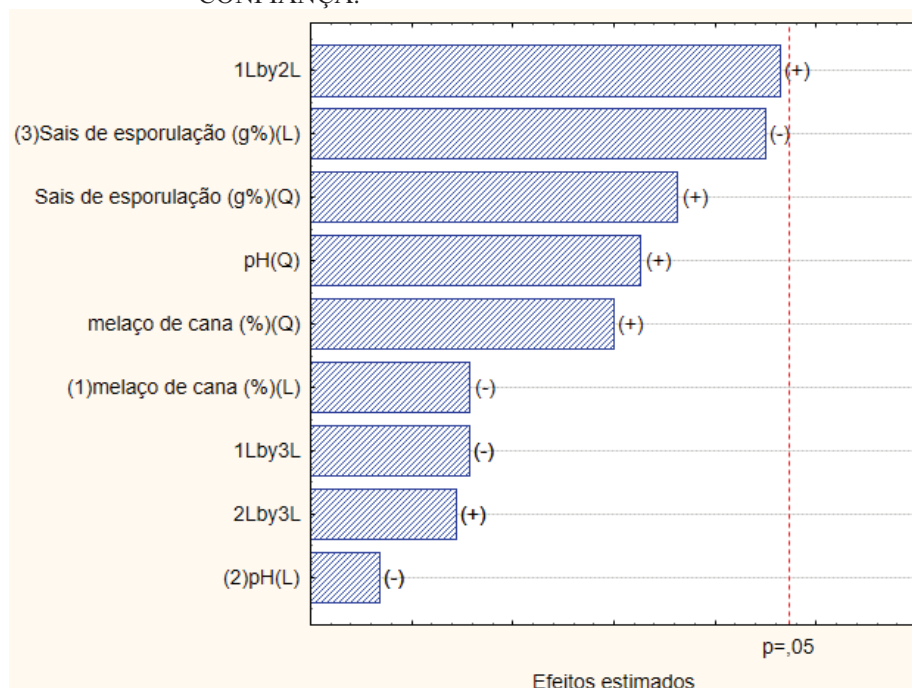
ENSAIO	pH	Sais de esporulação (g%)	Melaço de cana (g%)	Esporos (UFC/g de massa seca)
1	4,5	0,2	2,0	$2,3.10^{10}$
2	4,5	0,2	10,0	$1,1.10^{10}$
3	4,5	3,0	2,0	$1,4.10^{10}$
4	4,5	3,0	10,0	$2,6.10^9$
5	9,5	0,2	2,0	$6,5.10^9$
6	9,5	0,2	10,0	$1,4.10^9$
7	9,5	3,0	2,0	$7,8.10^9$
8	9,5	3,0	10,0	$6,2.10^9$
9	2,8	1,4	6,0	$4,3.10^9$
10	11,2	1,4	6,0	$1,0.10^{10}$
11	7,0	0	6,0	$7,7.10^9$
12	7,0	3,75	6,0	$2,9.10^9$
13	7,0	1,4	0	$3,5.10^9$
14	7,0	1,4	12,7	$8,4.10^9$
15	7,0	1,4	6,0	$6,1.10^9$
16	7,0	1,4	6,0	$1,1.10^9$
17	7,0	1,4	6,0	$3,9.10^9$

TABELA 31 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO SEGUNDO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1) Melaço de cana (L)	1,2.1019	1	1,2.1019	0,624	0,456
Melaço de cana (Q)	4,5.1019	1	4,5.1019	2,242	0,178
(2) pH (L)	2,3.1018	1	2,3.1018	0,115	0,744
pH (Q)	5,3.1019	1	5,3.1019	2,668	0,146
(3) Sais de esporulação (L)	1,0.1020	1	1,0.1020	5,049	0,059
Sais de esporulação (Q)	6,6.1019	1	6,6.1019	3,295	0,112
1L / 2L	1,1.1020	1	1,1.1020	5,394	0,053
1L / 3L	1,2.1019	1	1,2.1019	0,618	0,458
2L / 3L	1,0.1019	1	1,0.1019	0,521	0,494
Erro	1,4.1020	8	2,0.1019		
Total	4,7.1020	16			

$$R^2 = 0,71$$

FIGURA 30 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA.



Nenhum efeito significativo foi observado. O efeito linear mais próximo ($p=0,059$) e negativo foi a concentração de sais de esporulação. Com base na análise dos dados obtidos, observação do processo, testes anteriores (não demonstrados) e revisão da literatura, optou-se pela manutenção das seguintes variáveis nos respectivos valores: pH, 7,0; sais de esporulação, zero; tempo de incubação, 5 dias e tamanho médio da partícula 1,6 mm.

Na determinação das condições que maximizam a produção de esporos, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) fatorial com duas variáveis: concentração de melaço de cana e a taxa de inóculo. A Tabela 32 apresenta o delineamento experimental e os resultados obtidos.

TABELA 32 - RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis*.

Ensaio	Melaço de cana (g%)	Taxa de Inóculo (%)	Esporos (UFC/g massa seca)
1	3,0	3,0	$1,3.10^{10}$
2	3,0	9,0	$1,1.10^{10}$
3	9,0	3,0	$1,6.10^{11}$
4	9,0	9,0	$3,7.10^{10}$
5	1,8	6,0	$1,9.10^9$
6	10,2	6,0	$1,2.10^{10}$
7	6,0	1,8	$3,5.10^{11}$
8	6,0	10,2	$6,0.10^{10}$
9 (PC)	6,0	6,0	$3,8.10^{10}$
10(PC)	6,0	6,0	$3,6.10^{10}$
11(PC)	6,0	6,0	$3,0.10^{10}$

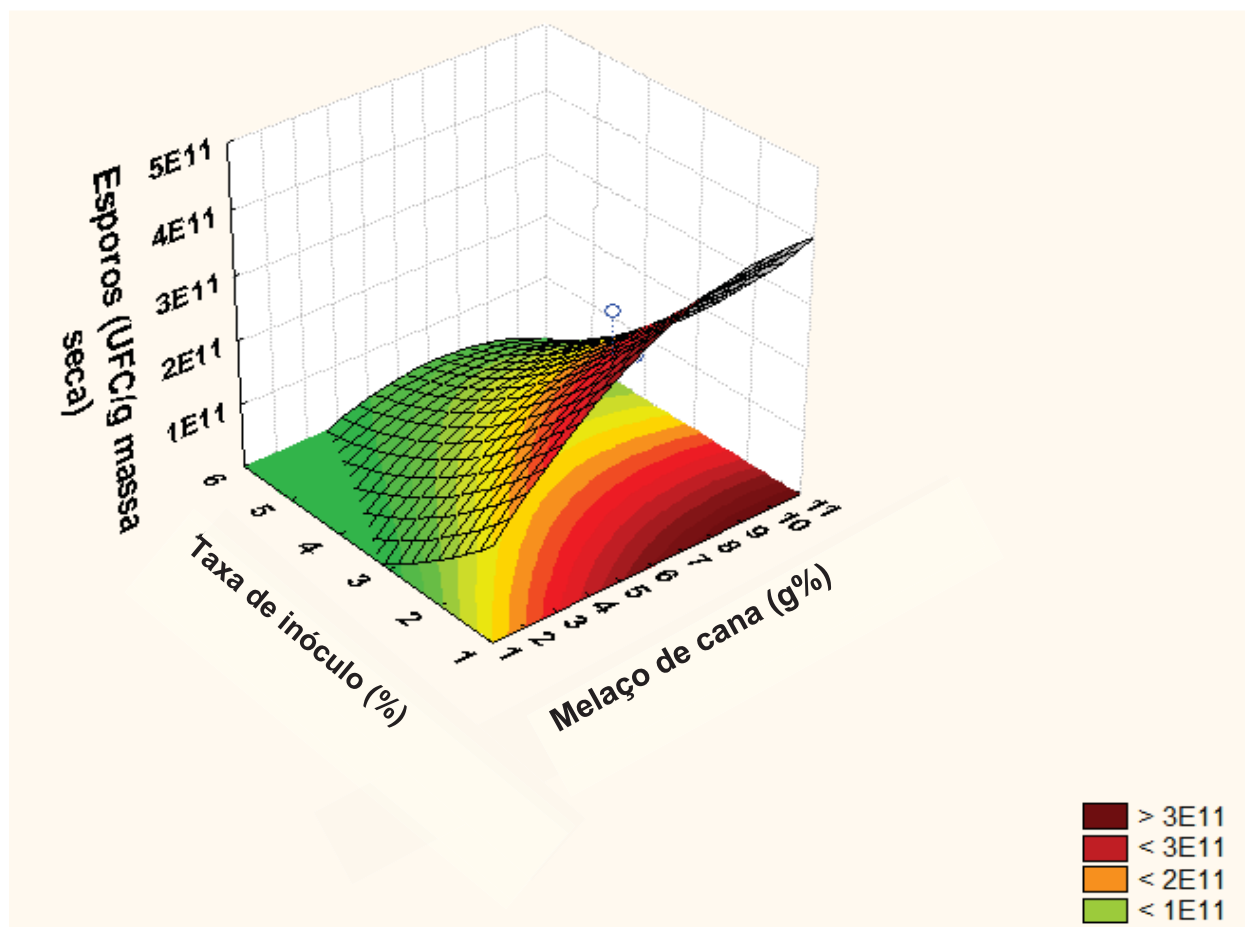
Na Tabela 33, que contém os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a variável produção de esporos, verifica-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,96 com uma percentagem de variância explicada de 0,82 com 95% de confiança, mostrando que o modelo foi bem ajustado para esta variável, sendo este estatisticamente significativo. Considerando que o modelo quadrático foi validado para a variável o mesmo foi usado para gerar as superfícies de resposta, (FIGURA 31) tendo o objetivo de otimizar o processo.

TABELA 33 – ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DA OTIMIZAÇÃO POR DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* POR FES, COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	Valor de <i>p</i>
(1) Melaço de cana (L)	4,4.1021	1	4,4.1021	1,174	0,328
Melaço de cana (Q)	4,2.1021	1	4,2.1021	1,128	0,337
(2) Inóculo (L)	3,6.1022	1	3,6.1022	9,451	0,028
Inóculo (Q)	2,9.1022	1	2,9.1022	7,827	0,038
1L / 2L	3,7.1021	1	3,7.1021	0,972	0,370
Erro	1,9.1022	5	3,8.1021		
Total	1,1.1023	10			

$R^2 = 0,82$

FIGURA 31 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING), COM MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.



O modelo com as variáveis codificadas que representa a produção de esporos (UFC/g), em função da % do inóculo e quantidade de melaço de cana (g%), na faixa estudada, está demonstrado pela equação polinomial de segunda ordem abaixo:

$$z = 182971770812,09 + 65110814038,45 * x - 3088990395,4601 * x^2 - 99841824592,76 * y + 8138333867,5785 * y^2 - 3361111111,1111 * x * y + 0,$$

ou

$$z = 1,8 \text{ E}11 + 6,5 \text{ E}10x - 3,1 \text{ E}9 x^2 - 1,0 \text{ E}11 y + 8,1 \text{ E}9 y^2 - 3,4 \text{ E}9 xy + 0$$

Sendo:

z = esporos (UFC/g), x = inóculo (%) e y = melaço de cana (g%)

Os resultados da validação experimental do modelo matemático descrito estão dispostos na Tabela 34.

TABELA 34 – VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Melaço de cana (y)	Inóculo (x)	Valor Previsto (Esporos,UFC/g) (massa seca)	Valor validado (Esporos,UFC/g massa seca)
9,0 g%	1,0%	$3,9.10^{11}$	$2,8.10^{11}$
6,0 g%	1,0%	$3,5.10^{11}$	$1,3.10^{11}$

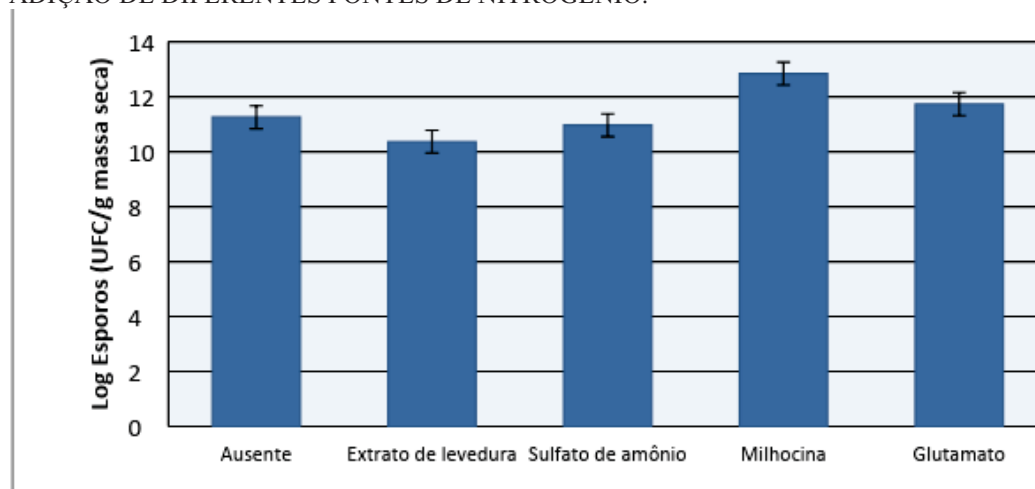
Não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a utilização de melaço de cana a 6% ou a 9%, optou pela menor concentração considerando os custos.

A adição de fontes complementares de nitrogênio ao processo otimizado resultou em um acréscimo de 1 log na produção de esporos, após a adição da milhocina (Tabela 35 e Figura 32).

TABELA 35 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

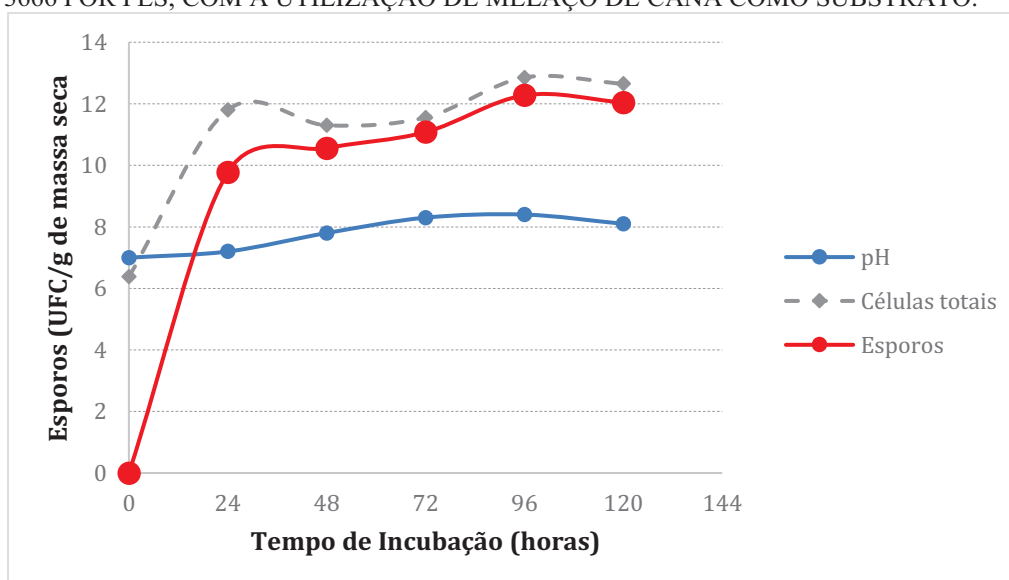
Fonte de nitrogênio	Esporos (UFC/g de massa seca)
Ausente	$1,8.10^{11}$
Extrato de levedura	$2,3.10^{10}$
Sulfato de amônio	$9,2.10^{10}$
Milhocina (<i>corn steep liquor</i>)	$6,9.10^{12}$
Glutamato	$5,4.10^{11}$

FIGURA 32 – PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.



A cinética do crescimento e esporulação do processo otimizado foi executada para, principalmente, confirmação dos resultados obtidos e determinação do tempo de incubação ótimo. A Figura 33 contém a representação gráfica da cinética com a produção máxima de esporos foi de $1,9^{12}$ UFC.grama massa seca⁻¹ e ocorreu após 96 horas de cultivo. Diferente das cinéticas que utilizaram o melaço de soja, o pH do meio foi subindo gradativamente até 96 horas de cultivo.

FIGURA 33- CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES, COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO.



O Quadro 10 contém as informações resumidas das condições ótimas das variáveis estudadas do processo de produção de esporos de *B. subtilis* B-3666, para a obtenção de 10^{13} esporos/g de massa seca e no Quadro 11 encontram-se resumidas todas as etapas executadas para a otimização deste processo.

QUADRO 9 - DESCRIÇÃO SUMÁRIA DOS ENSAIOS REALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO

Ensaio	Melaço de cana (%)	pH	Sais de espor. (g%)	Tamanho médio da Partícula (mm)	Taxa de Inóculo (%)	Tempo de incubação (dias)	Melhor Resultado	Efeitos significativos	R ²	obs
1-PB*	0 - 6,0	7,0-10,0	0-1,0	0,6-2,0	3,0	3 a 7	1,5 x 10 ¹¹	nenhum	0,50	Resultados indicativos, baixo R ²
1-DCCR*	1,5-4,5	6,5-8,5	0,1-0,2	1,9	3,0	5	6,5 x 10 ¹⁰	Melaço (+) Sais (+)	0,86	Indicativo do uso de maiores valores para as variáveis melaço e sais
2-DCCR*	2,0-10,0	4,5-9,5	0,2-0,3	1,9	3,0	5	2,3 x 10 ¹⁰	nenhum	0,71	Sais de esporulação apresentaram efeito negativo, porém não significativo
4 – Otimização DCCR	3,0 - 9,0	7,0	0	1,2 – 2,0	3,0	5	3,5 x 10 ¹¹	Inóculo (-)	0,82	Padronizado: Inóculo 1%
5- Validação da fórmula	6,0 e 9,0	7,0	0	1,6	1,0	5	1,3 x 10 ¹¹	n.a	n.a	Padronizado: Melaço 6%
6 – Fontes de nitrogênio	6,0	7,0	0	1,6	1,0	5	6,9 x 10 ¹²	Milhocina (<i>corn steep liquor</i>)	n.a	Padronizado: Milhocina (<i>corn steep liquor</i>)
7- Cinética	6,0	7,0	0	1,6	1,0	Até 7 dias	1,9 x 10 ¹²	Na	na	Padronizado: tempo de incubação de 5 dias

*= Ensaios preliminares

QUADRO 10 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO

Variável	Condições ótimas
Melaço de cana	6,0 g%
Inóculo	1,0% (v/v)
pH do substrato	7,0±0,5
Sais de esporulação	Ausente
Suporte	Casca de soja
Tamanho da partícula do suporte	1,18 a 2,0 mm
Umidade do suport.10 substrato- pré-esterilização	82±4%
Umidade inicial do fermentado (pós-esterilização)	70± 5%
Fonte de N	Milhocina (<i>corn steep liquor</i>) 0,3 g%
Tempo de incubação	5 dias

Obs; fermentação realizada em Frasco Erlenmeyer 125 ml, com a utilização de 10g de suporte e incubada a temperatura de 36°±1° C.

4.4 DISCUSSÃO

A utilização do método de planejamento fatorial, para a melhoria de processos que abrangem muitas variáveis, como é o caso da FES, é fundamental, pois torna possível o a redução de experimentos pelo planejamento sistemático, execução e avaliação estatística, economizando tempo e recursos financeiros (SILVA et al, 2008). O baixo ajuste ao modelo obtido com os resultados do planejamento experimental Plackett-Burman (R^2 baixo), pode ser o resultado de vários fatores, incluindo a falta de alguma variável importante no planejamento, o uso do modelo errado (por exemplo, um modelo linear usado quando a resposta da função é curva) e valores atípicos nos resultados (outliers) (SNEE, 2011). A influência da variabilidade do método de contagem de colônias para esporos (50 a 300% segundo a USP 24 (2006) também deve ser considerada, pois a variação intrínseca da medição pode ser uma fonte de baixo ajuste ao modelo.

O redesenho do planejamento com a utilização de o DCCR permitiu a redefinição das variáveis significativas e de suas faixas de estudo, bem como a obtenção de uma condição ótima com o ajuste da concentração dos melaços e da taxa de inóculo.

Embora a função dos sais indutores da esporulação (K_2HPO_4 , $MnSO_4$, $CaCl_2$ e $MgSO_4$) no cultivo e produção de esporos de *Bacillus* sp. esteja bem documentados na literatura (MOLIN & SVENSSON 1976; VASANTHA & FREESE 1979; HAGEMAN et al. 1984; CAZEMIER et al., 2001; LIU et al., 2005, SHI & ZHU, 2007; POSADA-URIBE et al. 2015), neste experimento sua influência positiva não foi demonstrada. O mesmo foi observado por Chen et al. (2010) na otimização da produção de esporos de *B. subtilis* por fermentação submersa e por Sella et al. (2013) na otimização da produção de esporos de *B. atrophaeus* por FES, justificado pela provável presença destes íons nos e subprodutos da agroindústria utilizados que contém em média de 10% de resíduo mineral e 75% de minerais sólidos, eliminando a necessidade desta complementação.

O pH é um dos fatores que mais influencia o desenvolvimento microbiano na FES. Nos experimentos realizados a variação do pH na faixa estudada (6,5 a 9,5) não apresentou nenhum efeito estatisticamente significativo na produção de esporos, e foi fixado em 7,0. Diversos pesquisadores afirmam que o pH ideal para que ocorra a esporulação, com a formação de esporos mais resistentes à temperatura, está na faixa de seis a oito (MAZAS et al. 1997; MONTEIRO et al, 2005, SELLA et al., 2009, SELLA et al., 2013, POSADA-URIBE et al., 2015). Warriner e Waites, 1999, sugerem que

mudanças no pH não pode ser implicadas em aumento do rendimento dos esporos e que a opção microbiana pela produção e assimilação de ácido é uma consequência da taxa de biomassa e não do pH externo. Esta ideia também é sustentada por El-Bisi e Ordal (1956) quando citam que a influência do pH é mínima sobre os rendimentos de esporos em cepas de *Bacillus subtilis*.

É amplamente conhecido que as bactérias, em geral, exigem maior disponibilidade de água para o seu cultivo por FES quando comparada aos fungos. A umidade ideal do fermentado está relacionada também à capacidade de absorção do suporte e da porcentagem de perda de água durante o processo de esterilização, que por sua vez varia de acordo com o tipo de reator utilizado e com o método de esterilização escolhido. Sella et al. (2009) obtiveram a melhor taxa de esporulação de *B. atrophaeus* em frasco Erlenmeyer e sacos plásticos, com 88 a 93% de umidade inicial, usando bagaço de cana como suporte e Massi et al. (2013) obtiveram esporos de *Bacillus amyloliquefaciens* por FES, usando como suporte farelo de soja, farelo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar com a umidade inicial do fermentado de 87 %, 87 %, 88 % e 76 %, respectivamente.

Na literatura, as poucas pesquisas que incluem o *Bacillus subtilis* e a casca de soja estão relacionadas à produção de biossurfactantes (MARTI, 2015), não sendo encontrados relatos de uso de casca de soja com a finalidade de produção de esporos.

Sabe-se que pequenas partículas de suporte podem fornecer uma grande área superficial para fixação microbiana. No entanto, partículas extremamente pequenas resultam em aglomeração de substrato que pode afetar a transferência de oxigênio, retardando o desenvolvimento de microrganismos. Portanto, as condições favoráveis desta variável precisam ser cuidadosamente avaliadas (ABU YAZID et al, 2017). O tamanho da partícula não apresentou diferença na produção fermentativa facilitando e minimizando condições operacionais de seleção granulométrica.

De acordo com Mitchell et al. (2000), o tamanho do inóculo tem uma grande importância na FES, para microrganismos de crescimento rápido quanto maior o inóculo mais rápido será o consumo do substrato, seguindo da redução significativa dos nutrientes disponíveis, condições na qual a esporulação tem início. Outra hipótese é que a maiores taxas de inóculo poderiam prover uma maior adição dos nutrientes do meio do inóculo ao meio de esporulação.

Nos estudos do processo esporulativo em *Bacillus subtilis* é reportado que nos primeiros estágios ocorre a formação de duas enzimas extracelulares: a serina protease alcalina, e a enzima metaloprotease neutra (Dancer & Madelstam, 1975), sendo a serina protease, responsável pela elevação dos valores de pH do meio (Kaur et al., 2001). A literatura reporta que a formação das proteases acontece logo nas primeiras horas de esporulação (entre 2 e 8 horas), sendo a serina protease necessária para a continuidade do processo, o que pode justificar a variação do pH em relação ao tempo de incubação observado na cinética da esporulação.

A adição de milhocina (*corn steep liquor*) como fonte de nitrogênio aumentou a produtividade dos esporos nos experimentos com a utilização de melado e melaço de cana. Nos experimentos usando o melaço de soja o extrato de levedura foi a fonte de nitrogênio que apresentou maior diferença. Considerando a quantidade mínima adicionada ao valor deste subproduto, trata-se de uma opção viável que contribui com a minimização de custos do meio de cultivo. As altas concentrações de extrato de levedura e podem gerar exaustão da fonte de carbono, causada pelo grande crescimento da biomassa, fatores estes que estariam diretamente relacionados aos processos esporulativos (FONTES et al, 2008).

Alguns pesquisadores trabalham no desenvolvimento de meios de cultivo que aumentem o grau de esporulação do *Bacillus subtilis*. Na literatura encontramos diferentes resultados: de $1,0 \times 10^5$ esporos/mL⁻¹ (CAYUELA et al., 1993) a $7,4 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹, em batelada alimentada (MONTEIRO et al., 2005), os quais também estão relacionados com a cepa utilizada e ao processo de cultivo.

Cesare-Vidaure et al. (1997) testaram diferentes subprodutos agroindustriais entre eles o melaço de cana (0,2-0,5%) como fonte de carbono, na obtenção de biomassa de *Bacillus subtilis* em meio líquido por 72 horas, 30°C e, obtiveram uma concentração de células de 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL, concluindo que o melaço de cana tem efeito positivo no crescimento do *Bacillus subtilis*.

No Quadro 12, é reportado por diversos autores o rendimento obtido nas fermentações sólidas a partir de ingredientes sintéticos aliados aos subprodutos industriais como melaços, bagaços, cascas e farelos. Nos estudos avaliados observa-se uma produção de esporos na ordem de 9 a 10 log, sendo que este estudo apresentou maiores rendimentos, 12 log.

QUADRO 11 - RENDIMENTOS OBTIDOS PELOS REGIMES DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM A UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA PARA DIFERENTES MICRORGANISMOS

CEPA	PROD UTIVIDADE (UFC/g)	REFERÊNCIAS
<i>Lactobacillus reuteri</i> G8-5	$1,4 \times 10^9$	ZHANG, et al., 2013.
<i>Bacillus subtilis</i> MA139	$2,4 \times 10^{10}$	
<i>Bacillus atrophaeus</i>	$3,3 \cdot 10^{10}$	SELLA <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus thuringiensis</i>	$5,0 \cdot 10^{10}$	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus licheniformis</i>	$1,7 \cdot 10^{11}$	ZHAO <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$4,0 \times 10^8$	SHIM, et al., 2010.
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,8 \times 10^9$	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,0 \times 10^4$	
<i>Aspergillus oryzae</i>	$2,6 \times 10^7$	

O melaço de soja não foi otimizado em maiores escalas considerando sua indisponibilidade comercial, sendo produzido por pouquíssimas empresas a nível nacional, dificultando a aplicação para a produção em largas escalas, este estudo demonstrou a produção de esporos na faixa de 13 log, no entanto o aumento de escala ainda deve ser testado neste tipo de fermentação corroborando com a reprodutibilidade dos resultados. As fermentações com melaço de cana atingiram 12 log. A formulação final envolvendo casca de soja, milhocina e melaço de cana evidenciam o baixo custo na formulação obtida. Zhao (2008) obteve rendimentos próximos com a Cepa de *Bacillus licheniformis*, porém com a inserção de diversos compostos comerciais de alto custo como glicose, extrato de levedura e peptona.

4.5 CONCLUSÃO

O uso do planejamento experimental para a otimização do processo mostrou-se eficaz na melhoria produção de esporos *do B. subtilis var. subtilis* B-3666 resultando, após a adição de fontes complementares de nitrogênio, em um aumento de até 02 log (100 vezes) com o uso de melaço de cana como substrato e de até 03 log (1000 vezes) com o uso de melaço de soja como substrato.

Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados na literatura e indicam o potencial do melaço de soja e do melaço de cana na produção de alta concentração de esporos pelo processo de fermentação em estado sólido.

O melaço de cana foi escolhido como principal substrato para a produção industrial devido a sua maior disponibilidade, com inúmeras empresas que o fornecem em âmbito nacional.

Trata-se de um substrato rico em açúcares, fonte de minerais como: cálcio, ferro, manganês, selênio, potássio e cobre. Além disso, possui baixa susceptibilidade a contaminação desde que adequadamente armazenado, baixo custo e abundante na região sul do país.

REFERÊNCIAS

- ABU YAZID N, NORAZIAH & BARRENA R, KOMILIS, DIMITRIOS & SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A Review, **Sustainability**. 9. 224., 2017.
- AYUB, M. A. Z. et al. Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos. **Relatório parcial PSPPG**, processo 520712/99-4, 2002.
- CASSALES, ANA et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675-4683, 2011.
- CAYUELA, C., KAI, K., PARK, Y.S., IJIMA, S., KOBAYASHI, T. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 75, 383–386, 1993.
- CAZEMIER AE, WAGENAARS SFM, TER STEEG PF. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from *Bacilli*. **Journal of Applied Microbiology** 90:761–770, 2001.
- CEGLA, U.G., SHUSTER, M. Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof. **United States Patent** 6,913,771, July 5, 2005.
- CESARE-VIDAURRE, T., CAMPOS, E., & CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Anais do VII Mexican Congress of Biotechnology and Bioengineering**, Mexico, 1997.
- CHEN, ZHEN-MIN et al. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1353-1360, 2010.
- DANCER, B.N., MANDELSTAM, J. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriol* 121, 406–410, 1975.
- EL-BISI, H.M.; ORDAL, Z.J. The effect of sporulation temperature on the thermal resistance of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. **Journal of Bacteriology** 71, 10–16, 1956.
- FONTES, G.C., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova** 31, 2091–2099, 2008.
- HAGEMAN JH, SHANKWEILER GW, WALL PR, FRANICH K, MCCOWAN GW, CAUBLE SM, GRAJEDA J, QUINONES C. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis* growth, sporulation, and extracellular protease production. **Journal of Bacteriology** 160:438–441. The heat resistance and amount of injury of spores from *Bacilli*. **J Appl Microbiology** 90:761–770, 1984.

KAUR et al., Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* P-2 | **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 17, 125–129, 2001.

LIU HUA-MIN & HAO-YANG LI. Application and Conversion of Soybean Hulls In "**Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**", book edited by Minobu Kasai, ISBN 978-953-51-3118-2, Print ISBN 978-953-51-3117-5, under CC BY 3.0 license. Published: May 3, 2017.

LIU JG, XING JM, CHANG TS, MA ZY, LIU HZ. Optimization of nutritional conditions for *nattokinase* production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. **Process Biochemistry** 40:2757–2762, 2005.

MARTI, M.E., COLONNA, W.J., REZNIK, G., PYNN, M., JARRELL, K., LAMSAL, B., GLATZ, C.E. Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactant by *Bacillus subtilis* on soybean co-products. **Biochemical Engineering Journal** 95, 48–55, 2015.

MARTI. et al. *Bacillus subtilis* está relacionado à produção de biossurfactantes. **Biochemical Engineering Journal**, 44, pp. 13-18, 2015.

MASSI, J. B., & REZENDE, M. I. Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b por Fermentação em Estado Sólido (FES) para a Produção de Biossurfactantes. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2(3esp), 38-41, 2013.

MAZAS, M., LOPEZ, M., GONZALEZ, I., BERNARDO, A. & MARTIN, R. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology** 25, 331–334, 1997.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MOLIN G, SVENSSON M. Formation of dry-heat resistant *Bacillus subtilis* var. *niger* spores as influenced by the composition of the sporulation medium. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 42:387–395, 1976.

MONTEIRO, S.M., CLEMENTE, J.J., HENRIQUES, A.O., GOMES, R.J., CARRONDO, M.J. & CUNHA, A.E. A. Procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Prog** 21, 1026–1031, 2005.

POSADA-URIBE, L.F., ROMERO-TABAREZ, M. & VILLEGAS-ESCOBAR, V. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. **Bioprocess Biosyst Eng** 38, 1879–1888, 2015.

REN, HANG, YA-TING SU, and XIAO-HUA GUO. “Rapid Optimization of Spore Production from *Bacillus Amyloliquefaciens* in Submerged Cultures Based on Dipicolinic Acid Fluorimetry Assay.” **AMB Express** 8 (2018): 21. *PMC*. Web. 20 Sept. 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL CR. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Appl Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SELLA, SANDRA REGINA BR et al. Soybean molasses-based bioindicator system for monitoring sterilization process: Designing and performance evaluation. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 18, n. 1, p. 75-87, 2013.

SHI, F. & ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. **Biocontrol** 52, 845–853, 2007.

SHIM, Y. H.; SHINDE, P. L.; CHOI, J. Y.; et al. Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 23, n. 4, p. 521–529, 2010.

SILVA, JOSÉ ALEXSANDRO et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

STULKE, J, and W. HILLEN. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. **Annu. Reviews Microbiology** 54:849–880, 2000.

SNEE, R.D. Think Strategically for Design of Experiments Success. **BioProcess International**, March 2011

VASANTHA N, FREESE E. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. **Journal Genetic Microbiology** 112:329–336, 1979.

USP 24. Chapter 55. Biological indicators resistance performance tests. In: The United States Pharmacopeia. 29rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WARRINER, K. AND WAITES, W. M. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on Medium containing Glucose: Ribose. **Letters in Applied Microbiology**, 29, 97-102, 1999.

ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**. v. 155, p. 343 – 347, 2013.

ZHAO S, HUN N, HUANG J, LIANG Y, ZHAO B. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. **Biotechnology Letters** 30:295–297. doi: 10.1007/s10529-007-9540-1, 2008.

ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**. v. 155, p. 343 – 347, 2013.

ZHENG S, TAN W, FENG L, LUO Z, XU T, ZHANG D, TAN S. Optimization of sporulation fermentation process of *Bacillus subtilis* NTGB-178. **Journal of Nanjing Agricultural University**; 40(6):1031-40, 2017.

CAPÍTULO IV

5. PRODUÇÃO EM ESCALA PILOTO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES BIORREATORES

5.1 INTRODUÇÃO

Após conhecer o comportamento microbiano, frente a diferentes composições de meios de cultivo e diferentes condições fermentativas, segue-se na etapa subsequente, na qual cada processo fermentativo já otimizado e validado deverá ser escalonado e estudado com critérios de viabilidade comercial do processo.

A avaliação do biorreator em escala piloto é uma etapa para o escalonamento do processo produtivo para a escala industrial. Diferentes tipos de biorreator podem produzir diferentes resultados em processos com as variáveis já padronizadas. Embora os frascos de Erlenmeyer sejam muito simples de serem utilizados, estes se aplicam para estudos iniciais e para a otimização das condições dos processos, pois possuem tamanho limitado (GANGULY & NANDI, 2015; SOCCOL et al, 2017). As fermentações estáticas, sem aeração e agitação, são indicadas para produção em larga escala de *Bacillus subtilis* var. *subtilis* devido à formação de biofilme durante o seu crescimento em suportes sólidos (MAHDINIA , DERMICI, 2017)

Diferentes tipos de biorreatores estáticos são usados para FES, como bandejas, biorreatores de leito fixo ou colunas Raimbault, frascos, garrafas Roux, sacos plásticos (*bags*) e garrafas rotativas sendo sua principal característica desses biorreatores é a ausência de agitação (DURAND, 2003, SINGHANIA et al., 2009, SPIER et al., 2016, SOCCOL et al., 2017).

O objetivo deste estudo é avaliar a produção de esporos do *Bacillus subtilis* var. *subtilis* em diferentes tipos de biorreator de fácil manuseio e aquisição (frasco, *Bag* e bandejas), a fim de ampliar a produção e maximizar o rendimento através da otimização do processo de produção nos reatores propostos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

- Micro-organismo

Cepa padrão do *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 liofilizada, isolada do *natto* comercial da empresa Hinode (Los Angeles, Califórnia), fornecida pelo banco de Cepas: Agricultural Research Service Culture Collection (EUA) – ARS (NRRL), mantida em refrigeração (4°C), com repiques periódicos trimestrais em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA).

- Inóculo

O inóculo foi produzido pela semeadura em tubos contendo 30,0 mL de caldo de soja tripticaseína (TSB), incubado por 18 horas a $35,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Com a biomassa de 6×10^6 UFC/mL.

- Fermentação em Estado Sólido

A FES foi realizada com os parâmetros definidos após a otimização do processo (Capítulo IV, Quadro 10). A casca de soja utilizada como suporte, fornecida pela Agropecuária Murici. A casca seca foi peneirada para obter um tamanho de partícula entre 1,18 mm a 2,0 mm. O substrato consistiu em: melaço de cana 6% (v/v) O melaço de cana (82, ° Brix a 20°C) foi fornecido pelo Grupo Moreno - Unidade de Luiz Antônio/SP-Brasil) com a composição: açúcar total 46,9%; proteína, 6,97%; lipídios, 9,72%, pH 5,7 e milhocina com 3,7(%p) Nitrogênio, 23 (%p) Carbono Orgânico, pH 4,3.

Para a obtenção de um fermentado com pH inicial de pH $7,0 \pm 0,5$ pós-esterilização, o pH do substrato foi ajustado 12,3. Este ajuste implicou em um acréscimo de Na (OH) 1M (quantificado posteriormente) em 26,66% de NaOH na quantidade de solução aquosa, evitando um ajuste posterior de pH e consequente contaminação.

O teor de umidade foi ajustado na proporção de 1,5 ml de água por grama de casca na composição do meio de cultivo, originando um valor de umidade do fermentado inicial em torno de 65% pós autocavação. Para a determinação da umidade foi utilizado um analisador de umidade por infravermelho (Top Ray, Bel Engineering, Italy).

Os frascos com meio de cultivo foram autoclavados a 121°C por 15 min. O tamanho do inóculo foi de 1,0% (substrato v/g). Os volumes calculados de inóculo foram misturados cuidadosamente com o meio autoclavado em ambiente asséptico (cabine de fluxo laminar). O SSF foi realizado a 35°C ± 1°C. Foram utilizadas 300g substrato seco para os diferentes biorreatores.

- 5.2.4 Reatores

Como reatores foram utilizados: Frasco de vidro tipo Fernbach de 1000 mL fechado com tampão de algodão; saco plástico de polipropileno (*bag*) 1000 mL fechado com tampão de algodão; bandeja plástica de polietileno 53cm X 37cm X 8cm, coberta com papel grau cirúrgico, altura do leito aproximadamente 5,0 cm.

- 5.2.5. Quantificação

Para quantificação da biomassa foram retiradas amostras, com uma pinça estéril, em cinco pontos equidistantes do fermentado. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro, pesados (antes e depois da amostragem). Foram adicionados 10,0 mL de água destilada estéril com 0,01% de Tween 80, agitadas em vortex por cinco minutos e filtradas em funil com peneiras em aço inoxidável previamente esterilizadas. O filtrado foi submetido ao aquecimento a 80°C por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes, armazenada a 5,0°C ± 3,0°C. As contagens de esporos viáveis foram feitas por diluições decimais em série em água esterilizada destilada e 50 µL de cada diluição foram inoculados em uma superfície de placa de ágar de soja tryptone, em triplicata. As placas foram incubadas durante a noite a 35°C ± 1°C. Foram consideradas a média dos resultados e os requisitos da Farmacopeia dos EUA (McCauley & Robichaud) que consideram de 50% até 300% como variação permitida na enumeração de contagens de esporos viáveis (USP 24 (2006)).

- Otimização - Planejamento Central do tipo composto central rotacional

Para determinar as condições que maximizam a produção de esporos no reator experimentalmente definido, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) fatorial completo 2^2 (duas variáveis estudadas em dois níveis), incluindo 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Foram analisados os efeitos das variáveis: taxa de inóculo e altura do leito.

TABELA 36 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Altura do leito (cm)	1,1	1,5	2,5	3,5	3,9
Inóculo (%)	0,7	1,0	5,0	9,0	10,7

Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo de segunda ordem conforme a equação 1, que descreve a superfície de resposta obtida.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Onde y representa a variável resposta, b representa os coeficientes de regressão, e x os valores codificados para as variáveis independentes.

A validação experimental dos resultados foi feita através da repetição do ensaio em quintuplicata, nas condições ótimas estabelecidas.

- Cinética

Foi realizada para acompanhamento dos parâmetros de produção de esporos, pH, e umidade do meio, bem como para a determinação do melhor tempo de incubação. A cinética foi realizada com os parâmetros do processo otimizado.

- Análise estatística

O planejamento fatorial experimental e a análise estatística dos resultados foram feitos através do uso do programa Statistic 8.0 (Statsoft Inc. 2007).

5.3 RESULTADOS

O formato e ao material pelo qual o biorreator é composto, pode influenciar a produtividade, devido às diferenças de acesso aos nutrientes e das trocas de calor entre o reator e o fermentado, que ocorrem por convecção. A Tabela 37 demonstra que os reatores tipo vidro e tipo bandeja proporcionaram uma maior produção de esporos.

TABELA 37 - PRODUÇÃO DE ESPOROS *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 EM REATOR VIDRO, BANDEJA E *Bag*

Reator	pH (inicial do fermentado)	pH (final de fermentação)	Umidade inicial do fermentado pós autoclavação	Umidade final do fermentado	Produção de esporos (UFC/g massa seca)
Vidro	7	8,3	65%	63%	$1,9 \cdot 10^{12}$
<i>Bag</i> (pp)	7	8,1	66%	63%	$3,7 \cdot 10^{11}$
Bandeja	7	8,8	65%	60%	$1,9 \cdot 10^{12}$

Afermentação no reator *Bag* proporcionou um decréscimo na produção de esporos em 1 log quando comparado aos reatores frasco de vidro e bandeja. A fim de avaliar se este processo ainda poderia ser maximizado, optou-se por estudar e otimizar a produção em bandeja, visto o processo de produção em frasco já estar otimizado.

As Tabelas 38 e 39, e a Figura 34 contém os resultados do DCCR para o estudo do efeito da taxa de inóculo e altura do leito.

TABELA 38 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING) E RESULTADOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES EM BANDEJA

ENSAIO	INÓCULO (%)	ALTURA DO LEITO (cm)	ESPOROS (UFC/g massa seca)
1	1	1,5	$6,5 \cdot 10^9$
2	1	3,5	$6,5 \cdot 10^{12}$
3	9	1,5	$1,6 \cdot 10^{11}$
4	9	3,5	$6,7 \cdot 10^{12}$
5	0,7	2,5	$9,1 \cdot 10^{10}$
6	10,7	2,5	$5,7 \cdot 10^{12}$
7	5	1,1	$1,0 \cdot 10^{10}$
8	5	3,9	$7,0 \cdot 10^{12}$

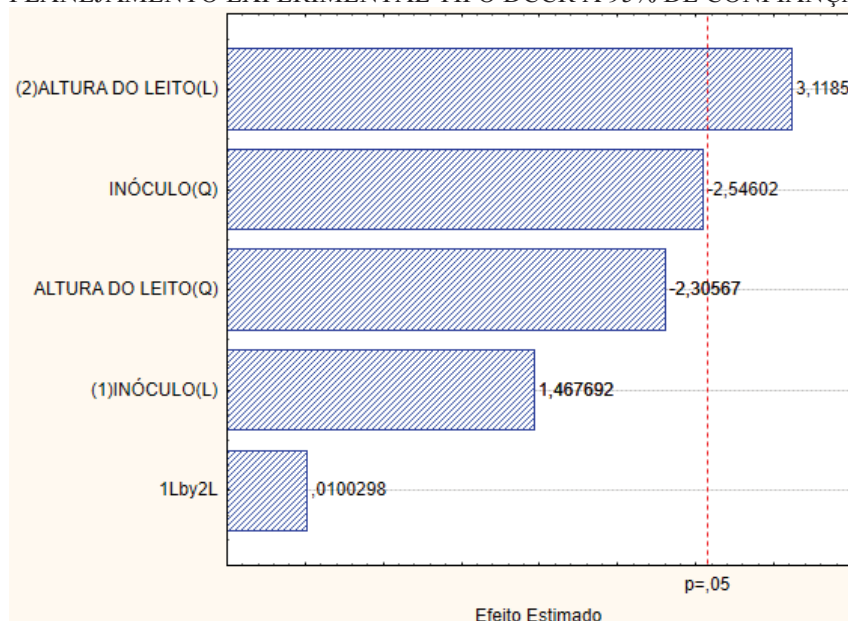
9	5	2,5	$6,7.10^{12}$
10	5	2,5	$9,7.10^{12}$
11	5	2,5	$1,1.10^{13}$

TABELA 39 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DO DCCR DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 PRODUZIDOS POR FES EM BANDEJA

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das médias	F	p
(1)INÓCULO (L)	$1,5.10^{25}$	1	$1,5.10^{25}$	2,154	0,202
INÓCULO(Q)	$4,4.10^{25}$	1	$4,4.10^{25}$	6,482	0,0515
(2)ALTURA DO LEITO(L)	$6,6.10^{25}$	1	$6,6.10^{25}$	9,726	0,0263
1L by 2L	$3,6.10^{25}$	1	$3,6.10^{25}$	5,316	0,069
Error	$6,8.10^{20}$	1	$6,8.10^{20}$	0,000	0,992
Total SS	$3,4.10^{25}$	5	$6,8.10^{24}$		
	$1,7.10^{26}$	10			

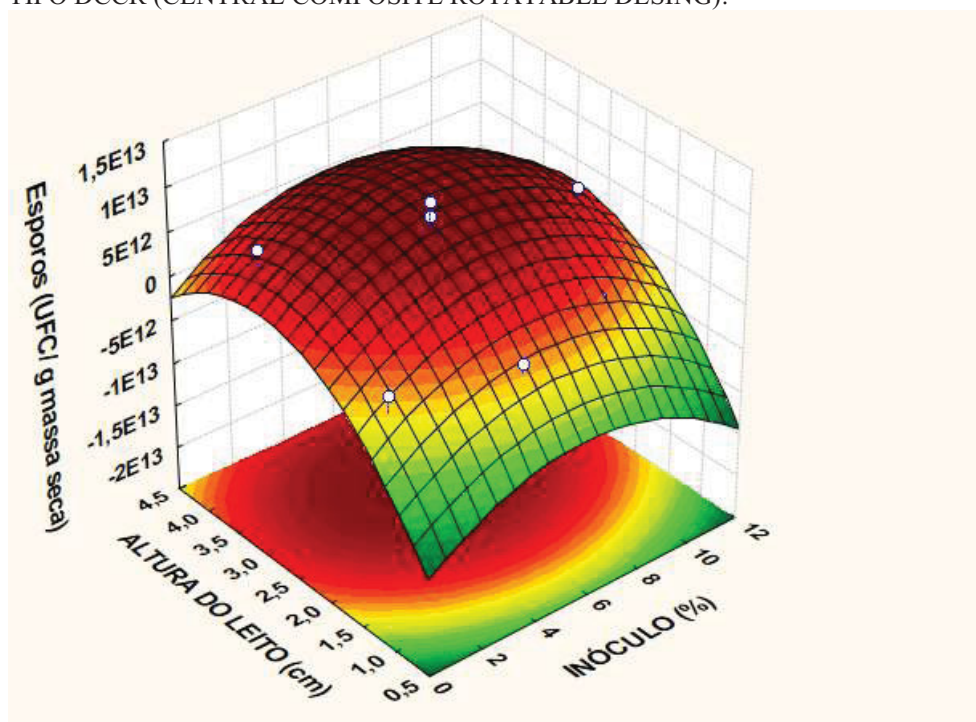
$R^2 = 0,80$

FIGURA 34 – DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR A 95% DE CONFIANÇA



O único efeito significativo observado foi a altura do leito. A Análise de Variância (ANOVA) para a variável produção de esporos sugere que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,80 com 95% de confiança, mostrando que o modelo foi bem ajustado para esta variável, sendo este estatisticamente significativo. Considerando que o modelo quadrático foi validado para a variável o mesmo foi usado para gerar as superfícies de resposta, (FIGURA 35) tendo o objetivo de otimizar o processo.

FIGURA 35 - SUPERFÍCIE RESPOSTA A OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES EM BANDEJAS PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR (CENTRAL COMPOSITE ROTATABLE DESING).



O modelo com as variáveis codificadas que representa a produção de esporos (UFC/g), em função da % do inóculo e altura do leito (cm), na faixa estudada, está demonstrado pela equação polinomial de segunda ordem abaixo:

$$z = -20947541706398 + 2359508803091,6 * x - 200067258399,77 * x^2 + 15419833625309, * y - 2511389729356,4 * y^2 + 3257420365,3936 * x * y + 0,$$

ou

$$z = -2,1 \text{ E } 13 + 2,4 \text{ E } 12 x - 2,0 \text{ E } 11 x^2 + 1,5 \text{ E } 13 y - 2,5 \text{ E } 12 y^2 + 3,3 \text{ E } 09 x y + 0$$

Sendo: z= esporos (UFC/g), x= inóculo (%) e y= altura do leito (cm)

O modelo estatístico foi validado pela condução da FES em condições ideais e determinando a produção de esporos. Os resultados destes experimentos são apresentados na Tabela 40.

TABELA 40 – VALOR PREVISTO E VALIDADO RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO

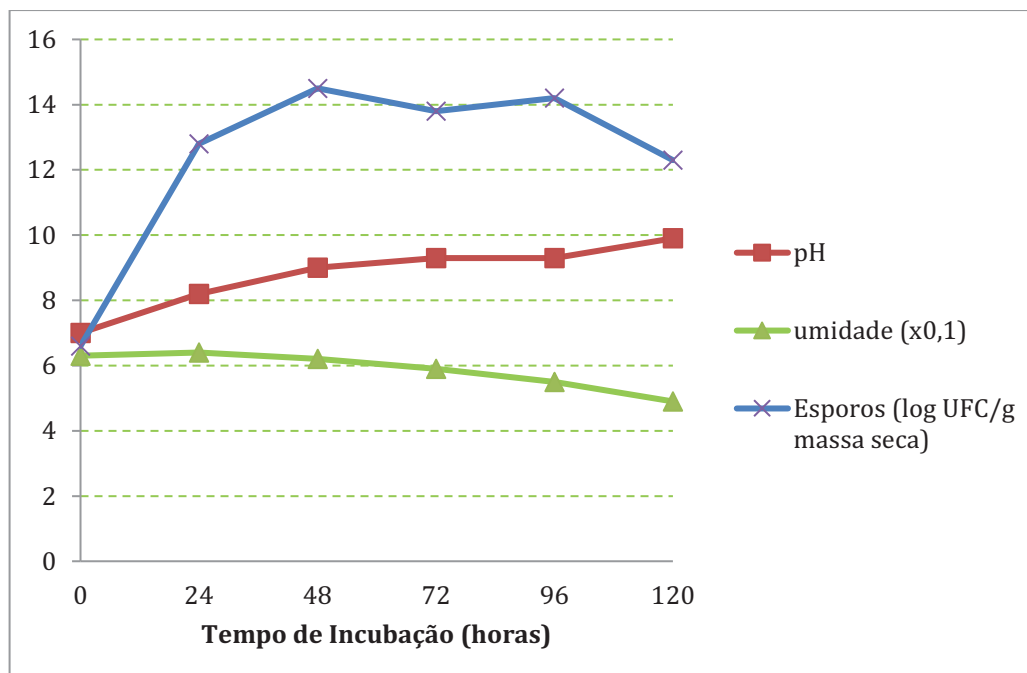
Altura do leito(y)	Inóculo (x)	Valor Previsto (Esporos,UFC/g) (massa seca)	Valor validado (Esporos, UFC/g massa seca)
3,0 cm	6,0%	9,7 .10 ¹²	2,3 .10 ¹³

A cinética do crescimento e esporulação do processo otimizado foi executada para confirmação dos resultados obtidos e determinação do tempo de incubação ótimo. Na Tabela 41 e a Figura 36 é apresentado que produção máxima de esporos foi de $3,2 \times 10^{14}$ UFC.grama massa seca⁻¹ e ocorreu após 48 horas de cultivo. O pH do meio foi subindo gradativamente, reproduzindo o observado na cinética de produção em frasco Erlenmeyer e a umidade, como esperado, reduziu com o aumento do tempo de incubação.

TABELA 41 - CINÉTICA DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE pH, UMIDADE E PRODUÇÃO DE ESPOROS NO REATOR TIPO BANDEJA

Tempo (horas)	0	24	48	72	96	120
pH	7,0	8,2	9,0	9,3	9,3	9,9
Umidade (%)	63,0	64,0	62,0	59,0	55,0	49,0
Esporos (UFC/g massa seca)	3,4.10 ⁶	6,7.10 ¹²	3,2.10¹⁴	6,5.10 ¹³	1,5.10 ¹⁴	1,8.10 ¹²

FIGURA 36 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ESPOROS DO *B. subtilis* var. *subtilis* B-3666 POR FES, EM BANDEJA COM A UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO



A otimização do processo de acordo com parâmetros apresentados na Tabela 42, aumentou em até 2 log a produção já otimizada em frasco de vidro e reduziu de 5 dias para 2 dias o tempo de incubação.

TABELA 42 CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES USANDO MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO E BANDEJA COMO BIORREATOR

Variável	Condições ótimas
Melaço de cana	6,0 g%
Inóculo	1,0% (v/v)
pH do substrato	7,0±0,5
Sais de esporulação	Ausente
Suporte	Casca de soja
Tamanho da partícula do suporte	1,18 a 2,0 mm
Umidade do suport. Substrato (pré esterilização)	82±4%
Umidade inicial do fermentado (pós esterilização)	70± 5%
Fonte de N	Milhocina (<i>corn steep liquor</i>) 0,3 g%
Altura do leito	3,0 cm
Tempo de incubação	2 dias

5.4 DISCUSSÃO

Este estudo tiveram como fundamentação a minimização das operações unitárias do processo, bem como a economia do custo de processamento aliada a alta produtividade. Nesta primeira etapa de escalonamento, foram comparados os resultados da fermentação otimizada em frasco Erlenmeyer de 125 mL com os botidos com os reatores vidro (100 mL), *Bag* e bandeja. O reator de vidro, frasco de Fernbach, com volume de 1000 mL foi selecionado para avaliação da produtividade pela sua conformação de fundo chato e por ser uma vidraria de uso tradicional em laboratório, representando em maior semelhança os pequenos reatores erlenmeyers usados nos experimentos iniciais de fermentação. O reator *Bag*, também chamado de biorreator alternativo, trata-se de um saco plástico (polipropileno transparente). Foram escolhidos para os testes por serem caracterizados por baixo custo (polipropileno), versatilidade e resistência ao processo de autoclavagem. A bandeja é considerada um modelo de fermentação simples, onde se deposita uma fina camada de substrato onde o micro-organismo é inoculado e sequencialmente incubado em estufas com umidade e temperatura controlada. Cada estufa pode acoplar um número diversificado de bandejas, para se atingir a capacidade de produção requerida pelo processo. São empregados há séculos no Oriente na fabricação de alimentos tradicionais (shoyu, miso) (MITCHELL, 2006).

Estes biorreatores operaram de forma estacionária, em estufas ajustadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A inserção de um termômetro digital no meio fermentescível apontou que os gradientes de temperatura podem chegar a 54°C (dado não demonstrado). Desta forma, atribuem-se as diferenças na produtividade dos esporos à disposição do fermentado no interior do biorreator, formato e ao material pelo qual ele é composto, parâmetros estes, que interferem nos diversos fenômenos difusivos de transferência de massa e calor no interior do fermentado.

Comparado ao reator *Bag*, o reator de vidro tipo Fernbach possui formato que apresenta maior espaço livre interno, sendo facilitada a difusão do oxigênio para dentro do leito poroso. Entre os muitos tipos de biorreatores utilizados para FES, o biorreator do tipo bandeja é o sistema preferido (Thomas et al., 2013), pois o aumento de escala é relativamente mais fácil o que pode ser feito aumentando o número de bandejas. No entanto, este sistema tem desvantagens, como: a dificuldade na manutenção da esterilidade, o que foi solucionado esterilizando as bandejas e mantendo-as durante a

fermentação envoltas em papel grau cirúrgico; necessidade de grande espaço de trabalho e esterilização do substrato separada (KRISHNA, 2005; MITCHELL et al., 2006; BHARGAV et al., 2008; DEMIR, TARI, 2016).

A umidade é citada como um dos fatores que mais interferem no preparo dos meios fermentativos. Nos experimentos realizados, observou-se que houve necessidade de ajustes e cálculos para atingir os valores otimizados para a umidade devido a alterações decorrentes do processo de autoclavação, o que pode ser observado no reator tipo vidro e nos reatores *bag*. Não foram observadas variações nos valores da umidade antes e pós autoclavagem no reator tipo bandeja devido ao meio fermentado ter sido autoclavado separadamente e coberto durante o processo de fermentação, excluindo a necessidade da inclusão desta variável no estudo de otimização.

O tamanho do inóculo pode afetar o início da esporulação. Um inóculo menor pode estender este período, pois a esporulação também está vinculada à redução de nutrientes no meio, enquanto que o tamanho maior do inóculo poderá aumentar a teor de umidade e/ou reduzir o tempo do início da esporulação (log fase), justificando assim o estudo da interferência desta variável, já otimizada para o reator frasco, na FES em bandeja. Embora a análise estatística tenha demonstrado um efeito não significativo para esta variável, a aplicação da equação obtida no processo de otimização indicou que um aumento de inóculo para 6,0% favoreceria o incremento da produção de esporos.

A metodologia aplicada para o ajuste do pH, alcalinizando o meio antes da esterilização a vapor, pode ter influenciado um aumento da produtividade da fermentação. Os açúcares não redutores (ANR), como é o caso da sacarose contida no melaço de cana, precisam sofrer hidrólise da ligação glicosídica para oxidar, gerando, neste caso, o grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose. Sendo assim, o meio básico favorece a hidrólise dos açúcares de cadeia grande no meio fermentescível no período de autoclavação, fenômeno este que libera moléculas menores de açúcares facilitando assim, o processo fermentativo (SAHA, 2003). Estas estratégias de hidrólise da sacarose são observadas tradicionalmente em processos fermentativos de fermentação alcoólica com o objetivo de maximizar o metabolismo microbiano e, desta forma, obterem-se maiores rendimentos. Além da hidrólise dos açúcares, os demais componentes do meio de cultivo também aumentam seu potencial fermentescível (CHANG, 2015).

Altura do leito foi uma variável significativa para a otimização. De acordo com Ashley e Mitchell (1999) a altura crítica do leito sempre deve ser considerada, e é definida

como a maior altura que pode ser utilizada sem que temperaturas indesejáveis sejam atingidas no leito do substrato durante a fermentação. Depende da taxa de crescimento específico microbiano, mecanismo de adesão, tipo de suporte e tamanho da partícula, bem como da velocidade superficial e temperatura de entrada do ar. Qualquer aumento adicional no volume levará a aumento de altura e conseqüentemente a temperatura crítica será excedida no topo do biorreator. Assim sendo uma vez atingida a altura crítica, esta deve ser padronizada e novos aumentos volume devem ser alcançados aumentando apenas o tamanho do leito. A compactação do meio, conseqüente de grande quantidade de massa de cultivo pode não ser favorável. Desta forma, observa-se que o reator bandeja fornece uma melhor distribuição da partícula e um meio não compactado. Esta ideia é reforçada por Zhang. et al. (2013), quando observou que quanto maior a massa de meio de cultivo, menor a contagem de esporos em UFC/g e menor a produção do composto alvo. A partir de 20 kg de fermentação, esta redução foi mais acentuada, sendo aconselhável não trabalhar com meios compactados.

Observa-se que o decréscimo da umidade do fermentador é acompanhado pelo aumento do pH e aumento da produção de esporos. Um leve decréscimo no início da fermentação também foi observado por Zhang. et al. (2013) na fermentação com *Bacillus thuringiensis* com o objetivo de produção de biopesticidas, com a utilização de na composição do meio de cultivo resíduos de cozinha suplementados com íons mistos, farelo de trigo e soja.

A produção em larga escala no reator *Bag* mantém a umidade do fermentado, até o final do processo, enquanto que no fermentador tipo bandeja, a umidade decresce em 22% no período de 120h. A perda de umidade é um fenômeno que já foi observado em reatores bandejas assim como os gradientes de temperatura, como *Bacillus subtilis* tem características e termoestabilidade os esporos conseguiram resistir por muitas horas de fermentação em baixa umidade preservando-se até o fim do experimento. Quando a umidade é mantida alta o destino metabólico se direciona os processos de fermentação e não aos processos de esporulação.

Nas mesmas condições de pH, temperatura e umidade inicial (65%), Zhao et al.(2008) também obtiveram altos rendimentos de esporos de *Bacillus* 1.7×10^{11} UFC/g substrato seco, num experimento de fermentação sólida, porém em um reator *Bag* diferenciado (*netting bag*), com a adição de ingredientes sintéticos e comerciais. Não foram encontrados na literatura resultados próximos ao obtido, produção de esporos de *Bacillus subtilis* atingindo 10^{13} UFC/g massa seca.

5.5 CONCLUSÃO

O formato e o material pelo qual o biorreator é composto influencia a fermentação, que levam em consideração que as trocas de calor entre o reator e o fermentado ocorrem por convecção. Tanto o reator tipo bandeja, como o frasco de vidro de 1000ml, permitiram uma produção de esporos de 10^{12} UFC/g massa seca. O reator tipo bandeja foi escolhido para continuidade da pesquisa por facilitar o aumento de escala e ser de mais fácil manuseio.

A aplicação do planejamento experimental como metodologia de otimização da produção apresentou, como resultado do processo validado o crescimento da produção em 1 log/g (10^{13} UFC/g massa seca), resultando em produtividade ainda não reportada na literatura.

Estudos complementares são sugeridos com a utilização de outros reatores para FES que possibilitem novos escalonamentos deste processo até o patamar industrial.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY VM, MITCHELL DA, HOWES T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Apr 1;3(2):141-50,1999.
- BHARGAV, S., PANDA, B.P., ALI, M., JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chem. Biochem. Eng. Quarterly** 22, 49e70, 2008. **Biochemical Engineering Journal**, 363 , pp. 1-13, 2003.
- CHANG CW Bioconversion of sugarcane bagasse and soybean hulls for the production of a generic microbial feedstock (**PhD Thesis**). University of Manchester, 2015.
- DEMIR H, TARI C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2016.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Solid-State Fermentation . 13, 113–125, 2003.
- GANGULY S, NANDI S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal** 102:2–5. doi:10.1016/j.bej.2015.03.020, 2015.
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Crit. Rev. Biotechnology** 25, 1e30, 2005.
- MITCHELL, D.A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Group I bioreactors: unaerated and unmixed. In: Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovic, M. (Eds.), Solid-state Fermentation Bioreactors: **Fundamentals of Design and Operation**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 65e76, 2006.
- MAHDINIA, E. A. DEMIRCI, A. BERENJIAN. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K2): a new perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(1), 7 pages, 2017.
- SAHA BC Hemicellulose bioconversion. **Journal Ind Microbiology Biotechnology**30:279-291, 2003.
- SINGHANIA R.R., PATEL A.K. , SOCCOLC.R. , PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, pp. 13-18, 2009.
- SOCCOL CR, DA COSTA ES, LETTI LA, KARP SG, WOICIECHOWSKI AL, DE SOUZA VANDENBERGHE LP. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**. Mar 22, 2017.
- SPIER M.R. , L.P.S. VANDENBERGHE, MEDEIROS A.B.P. , SOCCOLC.R. **Application of different types of bioreactors in bioprocesses**, 2016.

THOMAS, L., LARROCHE, C., PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. Journal** 81, 146e161. **World Journal of Microbiology. Biotechnol.**, 33 (2017), p. 2, 2013.

USP 24. Chapter 55. Biological indicators resistance performance tests. In: **The United States Pharmacopeia. 29rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convention**, 2006.

ZHANG, W., QIU, L., GONG, A., CAO, Y., WANG, B. Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. **BioResources** 8, 1124–1135. <https://doi.org/10.15376/biores.8.1.1124-1135>, 2013.

ZHAO S, HUN N, HUANG J, LIANG Y, ZHAO B. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. **Biotechnology Letters** 30:295–297. doi: 10.1007/s10529-007-9540-1, 2008.

CAPITULO V

6. FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO PROBIÓTICO

6.1 INTRODUÇÃO

O Processo de “*downstream*” se resume na realização de operações unitárias para isolamento e purificação de um produto. O seu objetivo é preparar um produto com a pureza requerida em uma forma aceitável ao mercado a que se destina (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000). A produção do probiótico desenvolvido, destinado à adição à ração animal não exige a extração do material fermentado para sua formulação, sendo esta mais uma das vantagens da produção por FES.

Para que o aditivo probiótico seja comercializado, o fermentado deverá passar pelo processo de secagem seguida de moagem, com o objetivo de o aumento da sua estabilidade (tempo de prateleira) e a redução do tamanho das partículas, a fim de proporcionar, uma mistura homogênea quando adicionado à ração animal. O fermentado probiótico originado pela fermentação do bacilo em casca de soja, apresenta perfil adequado para moagem, considerando que em moinhos industriais, apenas os materiais quebradiços podem ser processados. No entanto, estas operações devem preservar ao máximo as contaminações e ações mecânicas de forma a manter a maior quantidade de esporos viáveis no produto final.

A viabilidade de probióticos na matriz do fermentado depende de muitos fatores, tais como, pH, temperatura da estocagem, presença de microrganismos competidores e inibidores, e é fundamental que a atividade e viabilidade da cultura probiótica se estenda por um longo período de tempo (DE OLIVEIRA et al, 2002). Fatores como temperatura de secagem e de armazenamento e umidade também devem ser padronizadas, pois altas temperaturas podem afetar a estabilidade do probiótico (SAARELA et al., 2000).

O produto formulado consiste em uma preparação de esporos de *B. subtilis* var. *subtilis* (B-3666), destinados a utilização agropecuária no setor de alimentação de frangos (substituição ao uso de antibióticos, melhora geral nos parâmetros zootécnicos nos primeiros 21 dias), leitões (fases de amamentação e desmame) e bezerros para criação e é categorizado pelo (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA (Brasil) como aditivos zootécnicos, no grupo funcional de estabilizadores intestinais). Este

produto não deve apresentar potencial toxigênico, e deve ser presumido seguro para as espécies alvo e o meio ambiente.

Com a finalidade de assegurar um nível adequado de proteção da saúde humana, dos animais e do meio ambiente, o ministério da agricultura e pecuária (MAPA) define os procedimentos necessários à certificação e uso do produto final redigidos pela Instrução Normativa 13/04 (alterada pela Instrução Normativa nº 44/15) a qual aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal.

Este trabalho objetiva demonstrar que o produto desenvolvido, destinados à alimentação animal, observe as regras dispostas no Decreto nº 6.296/07 e na Instrução Normativa nº 13/04, considerando as respectivas alterações, além das demais legislações relacionadas. Portanto, a caracterização do produto fermentado terá como principal parâmetro a caracterização da cepa, a quantidade de células viáveis e estudos de estabilidade.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Produto: Fermentado contendo esporos de *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 em casca de soja com valores de produtividade de 10^{13} UFC/g massa seca.)

6.2.1 Secagem, moagem e estabilidade pós-moagem

Os experimentos de moagem e secagem foram realizados no Centro de Biotecnologia Agroindustrial e Agroalimentar do Paraná – CENBAPAR-UFPR. 900 g do fermentado ($3,5 \times 10^{13}$ UFC/g de massa seca, umidade inicial de 55%) foram colocados em três bandejas abertas, envoltas em papel cirúrgico e secado em estufa com aeração da marca Thoth (modelo 510.480, BRASIL) na temperatura de 45°C. A umidade foi monitorada até se manter constante, através do aparelho medidor de umidade por infravermelho da marca Top Ray Infrared Moisture Balance, Italy. A atividade de água (A_w) foi determinada a 21-22°C pelo aparelho Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Pullman, WA, USA)

Após a estabilização da umidade, foram retiradas, no mínimo, três amostras de cada bandeja e avaliadas quanto a viabilidade dos esporos (UFC/massa seca), o resultado

considerado foi a média das contagens. O produto seco foi estocado em frasco estéril a temperatura ambiente (e umidade não controlada).

Para a moagem, foi utilizado o moinho de facas da marca Marconi (modelo MA 580/E, BRASIL). O produto seco e moído foi armazenado a temperatura de 20°C em frasco de vidro estéril, vedado.

Para a análise de estabilidade do produto, foram retiradas três amostras em até 24 h, 30 e 60 dias para avaliação da contagem de colônias de *B. subtilis* e determinação da umidade. Foram testadas, no mínimo cinco amostras do produto.

6.2.2 Caracterização do produto

- Micro-organismo

Cepa padrão do *Bacillus subtilis* var. *subtilis* B-3666 liofilizada, isolada do *natto* comercial da empresa Hinode (Los Angeles, Califórnia), fornecida pelo banco de Cepas: Agricultural Research Service Culture Collection (EUA) – ARS (NRRL), mantida em refrigeração (4°C), com repiques periódicos trimestrais em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA).

- Análise do perfil metabólico e enzimático da cepa pré e pós-fermentação

Pré-fermentação: a cepa padrão foi cultivada em TSB por 24 horas e posteriormente subcultivadas uma vez em ágar de triptona e ágar de soja (TSA) durante 24 h.

Pós-fermentação: a suspensão de esporos, extraídos do produto, foi cultivada em ágar de triptona de soja (TSA) durante 24 h a 37°C, antes de serem testadas usando o sistema VITEK 2 (bioMérieux, France). A suspensão bacteriana foi ajustada para um padrão de 0,5 McFarland em 2,5 mL de solução de cloreto de sódio a 0,45% com um densímetro ATB 1550 (bioMérieux, França). O VITEK 2 usa fluorescência para monitorar 47 reações metabólicas com o cartão ID-GN e 43 reações metabólicas com o cartão ID-GP. O sistema automaticamente preenche, fecha e transfere cartões para uma incubadora. Após 5 a 8 h de incubação a 35,5° C, o relatório do perfil metabólico foi fornecido a partir do banco de dados do sistema. As análises foram feitas em triplicata que visa reduzir a variação do teste e aumentar a reprodutibilidade.

- Prova da catalase

A catalase degrada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com formação de oxigênio e água. Assim, a produção de catalase e a sua atividade pode ser detectada pingando-se uma gota de peróxido de hidrogênio 3% em uma lâmina e transferindo-se uma amostra das colônias isoladas das placas com TSA.

- Teste de hemólise

A atividade hemolítica foi determinada por cultura em placas de ágar sangue por 24-48 horas a 36°C.

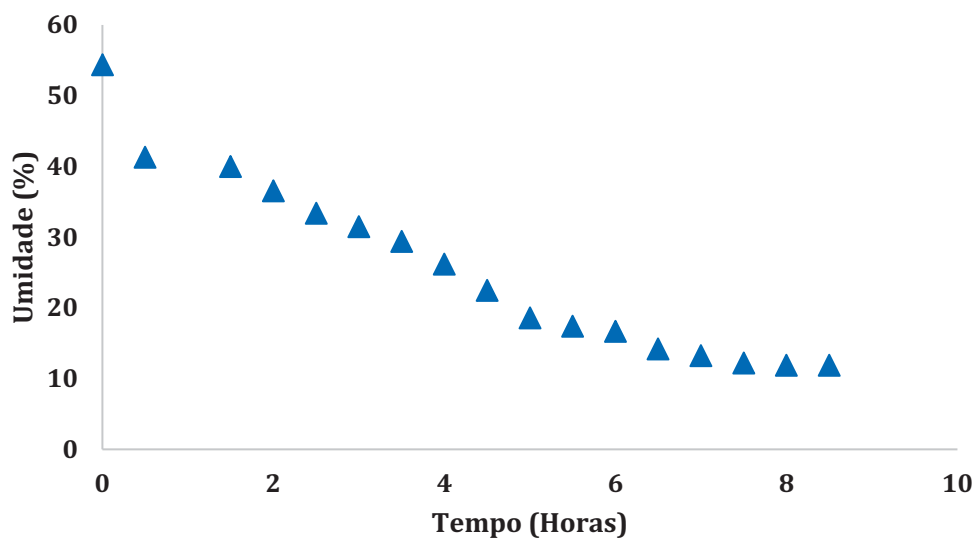
6.2.3 Viabilidade econômica

A avaliação da viabilidade econômica do processo, nesta etapa de escalonamento, tem como parâmetros os principais os custos de matéria-prima, ainda não sendo considerados os custos de operação, custos indiretos, de embalagem e demais.

6.3 RESULTADOS

A cinética de secagem do fermentado a 45°C está ilustrada na Figura 37, que contém dados a respeito da umidade do fermentado, estável a partir de oito horas de exposição, sendo mantida em aproximadamente $11,0 \pm 1,0$ %. As Figuras 31 e 32 apresentam dados da perda percentual de umidade com o tempo, durante a etapa do processo de secagem e o produto obtido após moagem, respectivamente.

FIGURA 37 – CINÉTICA DA SECAGEM DO FERMENTADO À 45°C



FONTE: O AUTOR (2018)

FIGURA 38 - SECAGEM DO FERMENTADO A 45°C.



FONTE: O AUTOR (2018)

A moagem foi executada no fermentado seco (com umidade de 11% e $1,2 \times 10^{13}$ UFC por grama de massa seca). Após o procedimento, a contagem foi de $8,6 \times 10^{12}$ UFC por grama de massa seca, o que está dentro dos limites de desvio da metodologia de contagem de colônias em placas (USP 24 (2006), comprovando, portanto, que os esporos são resistentes e se mantém viáveis pós moagem.

Após o processo de moagem, procederam-se as etapas subsequentes peneiramento nas peneiras de separação granulométrica e determinação da granulometria média. A quantificação da estratificação do produto de acordo com o tamanho médio da partícula é apresentada na Tabela 43.

TABELA 43 - ESTRATIFICAÇÃO DO FERMENTADO PÓS-MOAGEM DE ACORDO COM O TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA

Tamanho médio da partícula (mm)	Porcentagem (%)
0,84	6,3
0,42	58,5
0,18	27,5
0,04	6,0

FIGURA 39 - FERMENTADO SECO (A) E FERMENTADO PÓS MOAGEM.



Os resultados de estabilidade do produto fermentado estão dispostos na Tabela 44. A viabilidade do fermentado foi reduzida em 1 log, no entanto, estudos futuros devem ser conduzidos de forma a padronizar e estabelecer parâmetros como: temperatura de armazenamento, umidade do ambiente, tipo de embalagem, entre outras, que podem influenciar na estabilidade do produto final.

TABELA 44 – ESTABILIDADE DO PRODUTO APÓS SECAGEM A 45 °C, CONSERVADO À TEMPERATURA AMBIENTE.

Tempo (dias)	Esporos (UFC / g de massa seca)	A_w
0	$5,4 \cdot 10^{13}$	0,203
30	$3,8 \cdot 10^{12}$	0,328
60	$3,5 \cdot 10^{12}$	0,375

FONTE: O AUTOR (2018)

A origem da cepa está demonstrada no seu "Certificado de origem" (Anexo 1), sua identificação molecular a nível de espécie está disponível junto a coleção oficial de cultura de origem, a ARS Culture Collection.

Os resultados da determinação do perfil metabólico da cepa estão resumidos nas Tabelas 45 e 46, e sugerem leves alterações fenotípicas durante o processo fermentativo.

TABELA 45 - PERFIS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS DE *Bacillus subtilis* B-3666

MANTIDOS PRÉ E PÓS-FERMENTAÇÃO				
Análise	Abreviação	Resultado	Literatura	Referencia
D-Amigdalina	AMY	+		
Ala-Phe-Pro Arilamidase	APPA	-		
Leucina Arilamidase	LeuA	-		
Alanina Arilamidase	AlaA	-		
D-Ribose	dRIB	+	+	Aryal, 2016
D-Rafinose	dRAF	-	+	Aryal, 2016
			variavel	O'donnell, 1980
Resistência à optoquina	OPTO	+		
Fosfatidilinositol	PIPLC	-		
Fosfolipase C				
Ciclodextrina	CDEX	-		
L-Prolina Arilamidase	ProA	-		
Tirosina Arilamidase	TyrA	+		
Alcalinização de L-lactato	ILATk	+		
Crescimento em 6.5% NaCl	NC6.5	+	+	O'donnell, 1980
Resistência à O/129 (comp.vibrio.)	O129R	+		
D-Xilose	dXYL	-	+	Aryal, 2016
			variável	O'donnell, 1980
L-Aspartato Arilamidase	AspA	-		
Beta Glicuronidase	BGURr	-		
D-Sorbitol	dSOR	+	+	Aryal, 2016
				O'donnell, 1980
Lactose	LAC	-	variavel	Aryal, 2016
D-Manitol	dMAN	+	+	Aryal, 2016
				O'donnell, 1980
Salicina	SAL	+	+	O'donnell, 1980
Arginine Dihydrolase 1	ADH1	+	+	O'donnell, 1980
Beta Galactopiranosidase	BGAR	-		
Alfa-Galactosidase	AGAL	-	variável	Aryal, 2016
				O'donnell, 1980
Urease	URE	-	-	Aryal, 2016
N-Acetil-D-Glicosamina	NAG	+	variável	O'donnell, 1980
D-Manose	dMNE	+	+	Aryal, 2016
Sacarose/Sucrose	SAC	+	+	Aryal, 2016
Beta-Galactosidase	BGAL	+	variaável	Aryal, 2016
				O'donnell, 1980
Alfa-Manosidase	AMAN	-		
L-Pyrrolidonil-Arilamidase	PyrA	+	+	O'donnell, 1980
Resistência à Polimixina B	POLYB	+		
D-Maltose	dMAL	+	+	Aryal, 2016
Metil-B-D-Glicopiranosídeo	MBdG	+		
D-Trealose	dTRE	+	+	Aryal, 2016
Alfa-glicosidase	AGLU	+	+	O'donnell, 1980
D-Galactose	dGAL	-	variável	Aryal, 2016
Resistência à Bacitracina	BACI	+		
Pululano	PUL	-		
Arginina Dihidrolase 2	ADH2s	-	-	Aryal, 2016

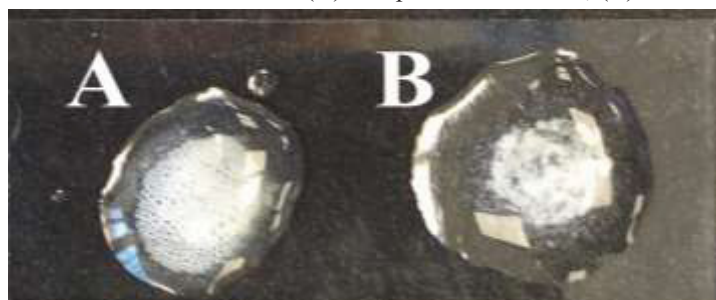
Produção de H ₂ S	H ₂ S	-	-	O'donnell, 1980
Beta-Glicosidase	BGLU	+	+	Aryal, 2016
Glicina Arilamidase	GlyA	-	-	O'donnell, 1980
Adonitol	ADO	-	-	Aryal, 2016
Lipase	LIP	-	-	
Ornitina Descarboxilase	ODC	-	-	
Glu-Gly-Arg-Arilamidase	GGAA	-	-	
Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	-	-	
Palatinose	PLE	+	-	
Alcalinização de Succinato	SUCT	-	-	
Lisina Descarboxilase	LDC	-	-	Aryal, 2016
Assimilação de L-Malato	IMLTa	-	-	
L-Arabitól	IARL	-	-	Aryal, 2016
D-Glicose	dGLU	+	+	Aryal, 2016
Citrato (Sódio)	CIT	-	+	O'donnell, 1980
Beta-N-Acetil	NAGA	-	-	Aryal, 2016
Assimilação de L-Histidina	IHISa	-	-	
Assimilação de D-Celobiose	dCEL	+	+	
Gama-Glutamil-Transferase	GGT	-	-	
Beta-Xilosidase	BXYL	-	-	
Malonato	MNT	-	-	
Assimilação de L-Lactato	ILATa	-	-	
Beta-Galactosidase	BGAL	-	variavel	O'donnell, 1980
Fermentação / Glicose	OFF	-	-	O'donnell, 1980
Beta-Alanina Arilamidase	BAlap	-	-	
Pna				
5-Ceto-D-Gluconato	5KG	-	-	

TABELA 46 - PERFIS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS DE *Bacillus subtilis* B-3666 MODIFICADOS PÓS-FERMENTAÇÃO

Análise	Abreviação	<i>B. subtilis</i> B3666	<i>B. subtilis</i> B3666 pós fermentação
Alcalinização de L-Lactato	ILATk	+	-
Resistência à O/129 (comp.vibrio.)	O129R	+	-
Beta-N-Acetil-Glicosaminidase	BNAG	+	-
D-Tagatose	dTAG	-	+
L-Pyrrolidonil-Arilamidase	PyrA	+	-
Tyrosina Arilamidase	TyrA	-	+
Ellman	ELLM	-	+
Urease	URE	-	+
Courmarato	CMT	+	-
Resistência à Novobiocina	NOVO	+	-
Fosfatase	PHOS	+	-

O resultado do teste de catalase para o *B. subtilis* B-3666 foi positivo, demonstrado pela formação de bolhas, evidenciando a liberação de oxigênio da H_2O_2 . A Figura 40 mostra o resultado do teste da catalase, comparando o resultado de *Streptococcus aureus* (controle positivo) com *B. subtilis* B-3666.

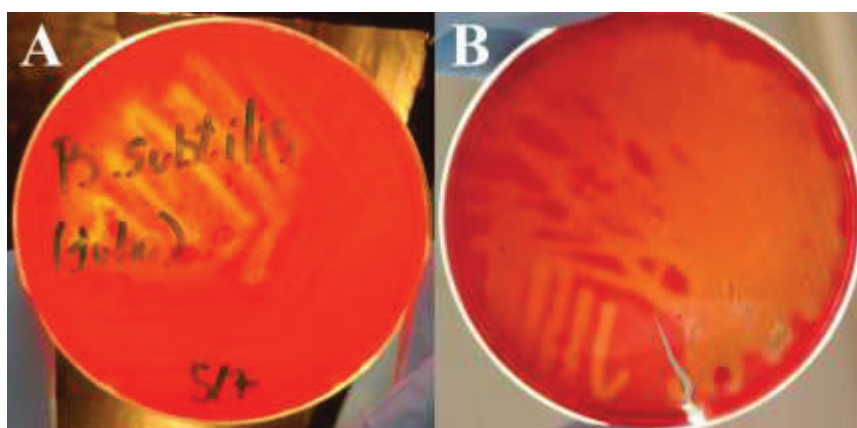
FIGURA 40 - TESTE DA CATALASE. (A): *Streptococcus aureus*; (B) *Bacillus subtilis* B-3666



FONTE: O autor (2018).

A análise das culturas de *B. subtilis* e *Streptococcus pyogenes* (controle) em placas com ágar sangue (FIGURA 41), apresenta o resultado que ambas as cepas são hemolíticas, formadoras de β -hemólise, demonstrada pela da formação de halos transparentes ao redor das colônias.

FIGURA 41- TESTE DE HEMÓLISE. (A) *Bacillus subtilis* B-3666; (B) *Streptococcus pyogenes*



FONTE: O autor (2018).

6.3.1 Análise de custos

Conforme informações contidas no Quadro 14, o custo da matéria-prima para a produção de 1,0kg do probiótico desenvolvido (esporos de *B.subtilis* B-3666 com

concentração mínima de $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g) é em torno de R\$ 1,10. O preço de venda de aditivos probióticos encontra-se consideravelmente acima desse valor: o quilograma do aditivo BioPlus® PS (composto por *B. subtilis* e *B. licheniformis* na ordem mínima de $1,6 \times 10^9$ UFC/g cada) é vendido a R\$ 349,14/kg, enquanto que do GalliPro® (composto por *B. subtilis* na ordem mínima de $1,6 \times 10^9$ UFC/g), a R\$ 18,91/kg (preços de agosto/2018). Vale ressaltar que estudos futuros são necessários para avaliar a viabilidade econômica no que tange à aplicação do processo em escala industrial.

QUADRO 12 - CUSTOS DE MATÉRIA PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE 1,0 KG DO PROBIÓTICO DESENVOLVIDO

COMPONENTES DO MEIO FERMENTATIVO	VALOR DE MERCADO (agosto/2018)	Preço por kg	Quantidade (kg) para produção de 1,0 kg do produto	Custo para a produção de 1,0 Kg
Melaço de cana (0,216 ml/g de casca)	R\$ 780,00 TON	R\$ 0,78	0,3	R\$ 0,24
Casca de soja	R\$ 310,00 TON	R\$ 0,31	1,000	R\$ 0,31
Milhocina (corn steep liquor)	R\$ 300,00 TON	R\$ 0,30	0,0108	R\$ 0,003
Na (OH) 1M	R\$ 3200,00 TON	R\$ 3,20	0,01596	R\$ 0,05
Inóculo (TSB)	R\$ 218,39 (0,5 Kg)	R\$ 436,78	0,00108	R\$ 0,50
CUSTO DE MATÉRIA PRIMA				R\$ 1,10

FONTE: COTAÇÃO MF RURAL/ ALIBABA (2018)

6.4 DISCUSSÃO

Está amplamente documentada que a adição de *B. subtilis*, como aditivo probiótico, à alimentação animal melhora o desempenho de crescimento, a digestibilidade de nutrientes e a qualidade da carne (MENG et al., 2010; GIANG et al., 2011; CUI et al., 2013, SHENG et al, 2016). A dosagem do probiótico é de extrema importância, uma vez que uma quantidade mínima de células deve alcançar o intestino de forma que os esporos possam germinar e executar os mecanismos de probiose de forma eficaz. Um dos parâmetros de avaliação da eficácia de um produto probiótico são as unidades formadoras de colônia por grama no produto final (UFC/g). A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g de produto, já considerando perdas em exposição a fatores químicos e físicos, para que exista uma quantidade suficiente para exercer a probiose.

O tempo e a temperatura de secagem podem interferir diretamente no prazo de validade do produto final, segundo Couch e Ignoffo (1981), a baixa umidade é essencial para a preservação celular, pois esta pode, quando aumentada, favorecer à germinação dos esporos ou ainda permitir o crescimento de microrganismos contaminantes, que contribuem para a redução do número de microrganismos viáveis no produto. Anagnostopoulos & Sidhu (1981) citam que a porcentagem de germinação decresce com a redução da atividade de água do meio. Os resultados obtidos nos testes de estabilidade demonstraram que o produto se mantém estável por até 60 dias (período máximo estudado), sendo sua concentração final 10^{12} UFC/g de produto, 3 logs superior ao exigido. Os resultados encontrados corroboram as informações da literatura, nas quais afirmam-se que produtos probióticos contendo *Bacillus* em sua forma esporulada apresentam estabilidade considerável (ELSHAGHABEE et al., 2017). A perda de 01 log de esporos em 60 dias indica que devem ser testados outras faixas de temperatura x tempo de secagem, visto que esporos do gênero *Bacillus* resistem a altas temperaturas no calor seco, bem como estudadas novas formas de acondicionamento do produto. Deve ser considerada também a variação da técnica de contagem de colônias, que segundo a USP 24 (2006) pode variar de 50 a 300%.

Os mais relevantes parâmetros de segurança para uso de bactérias como probióticos incluem: a origem da estirpe, identificação molecular adequada no nível de espécie, não apresentar patogenicidade, não apresentar histórico de associação com doenças ou distúrbios intestinais, não carrear genes plasmidiais de resistência a antibióticos, não

causar degradação de muco intestinal, não permitir a translocação ou indução translocação de micro-organismos patogênicos para sítios extra-intestinais. (SAARELA, 2000; FAO/WHO, 2001). A espécie bacteriana *B. subtilis* é considerada pela EFSA como adequada para a abordagem qualificada de segurança (QPS) (EFSA, 2007; EFSA BIOHAZ Painel 2013). Esta abordagem exige que além da identidade da cepa seja estabelecida conclusivamente, a evidência que estas não possuem potencial toxigênico e que não apresentam resistência a antibióticos de importância humana e veterinária.

O perfil metabólico e enzimático da cepa de *Bacillus subtilis* B-3666 pré e pós-fermentação acompanha o descrito na literatura por O'donnell, 1980 e Aryal, 2016. Algumas alterações fenotípicas foram observadas pós-fermentação. Características físicas do suporte para o cultivo em estado sólido, umidade, pH e privação de nutrientes são alguns dos fatores que podem ter influenciado todas as alterações descritas. Não foram encontrados na literatura relação entre as alterações fenotípicas observadas e a atividade probiótica; As alterações fenotípicas em *Bacillus* foram discutidas por Sella et al, 2009, que sugere que o microrganismo após a fase de esporulação no regime de fermentação sólida apresente modificações relacionadas a regulação da expressão gênica. De Vries et al., 2005) também corroboram a ideia que as diferentes condições da FES podem levar a uma alteração da expressão de genes diferentes, e, consequentemente afetar vários fenótipos.

Os resultados do teste de catalase estão de acordo com o descrito por Hosoi et al. (2000) que observaram que o *B. subtilis* (*natto*) produz uma catalase, inclusive com ação de promoção de crescimento de lactobacilos e Naclerio et al. (1995) citam que uma forte atividade da catalase durante a fase estacionária de crescimento quando cultivado em meio rico.

Geralmente a atividade hemolítica está relacionada à virulência da cepa. No caso do *B. subtilis* a atividade β -hemolítica é considerada uma característica da cepa (DE VOS, 2015), e é associada à produção tanto de enzimas fibrinolíticas quanto de lipopeptídeos (CAO et al, 2009). Esta relação peculiar é atrativa devido ao fato da atividade fibrinolítica comprovada (desagregação e dissolução progressiva dos coágulos sanguíneos do nosso organismo) das *nattoquinases*, e consequentemente, serem associadas à melhora de doenças cardiovasculares, trombose e diminuição dos casos de AVC. No entanto, urge salientar que processos de hemólise envolvendo *B. subtilis* ainda precisam ser elucidados no sentido de estabelecer de que forma o equilíbrio hemostático é estabelecido relacionando a atividade β -hemolítica com a secreção de *nattoquinases*.

Huang et al. (2009) associaram a atividade hemolítica à produção de Subtilosina A1, uma variante da subtilosina A produzida por *B. subtilis*, que possui atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus carnosus* e *Listeria monocytogenes*. Estudos complementares serão necessários para o isolamento e a identificação do metabólito produzido que apresenta ação hemolítica.

A enzima *nattoquinase*, secretada pelo *B. subtilis*, também é associada adjuvante nos processos de terapias de doenças cardio vasculares. Sendo que o único caso encontrado em literatura com problemas associados a esta enzima, é reportado por Chang (2008) e refere-se ao caso da ingestão simultânea de aspirina e 400 mg de nattoquinase, causando hemorragia cerebral.

A literatura corrobora que *B. subtilis* B-3666 é utilizado na fermentação da soja para a produção do alimento de consumo humano (*natto*) (KUBO et al., 2014). Estudos reforçam a biossegurança da utilização de espécies de *Bacillus subtilis*, além de sugerir que esta bactéria seja um micro-organismo comensal, de fácil adaptação e colonização do epitélio intestinal (HONG et al., 2009)

A viabilidade econômica do produto desenvolvido foi demonstrada inicialmente através do levantamento dos custos da matéria prima, cujo valor para a produção de 1,0 kg (aproximadamente R\$ 1,10) representa menos de 10% do preço do produto similar mais barato no mercado. Sendo que o produto desenvolvido apresenta uma concentração de esporos, no mínimo, 3 log/g superior, permitindo sua diluição em 1/1000 para se igualar ao produto similar. Considerando que foram escolhidos para o desenvolvimento deste processo os produtos das Indústrias regionais e escolhidas técnicas de minimização de equipamentos e operações unitárias na fabricação do aditivo, estes fatores impactaram em uma maior redução de valores quando da avaliação dos custos do processo industrial como um todo.

6.5 CONCLUSÃO

O perfil enzimático e bioquímico da cepa utilizada indicou que esta manteve suas principais características pré - e pós-fermentação, quando comparado descrito na literatura. Houve poucas alterações fenotípicas, esperadas pós-fermentação por FES e não relatadas como interferentes na ação probiótica do micro-organismo.

A quantificação de esporos manteve-se praticamente estável após os processos de moagem e secagem por até 60 dias (tempo máximo do estudo), sendo que a redução de 1 log poderá ser futuramente evitada com estudos da secagem em outras temperaturas e de condições de embalagem e armazenamento. Mesmo com esta leve redução, o produto apresentou 3 logs de esporos/g superior às exigências para comercialização o que impacta positivamente na sua viabilidade econômica. Estes resultados são indicativos de segurança e estabilidade do produto, porém estudos futuros *in vivo* devem ser realizados, no que tanger à comprovação na melhora dos parâmetros zootécnicos exigidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e realizados testes adicionais de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

A formulação da ração juntamente com o produto também deve ser testada quanto à estabilidade quando misturada com uma pré-mistura de ração animal, frente às condições de moagem e granulação.

REFERÊNCIAS

- ANAGNASTOPOULOS, G. D. and SIDHU, H. The effect of water activity and the a_w controlling solute on spore germination of *Bacillus stearothermophilus*. J. **Applied Bacteriology** 257 50:335-349, 1981.
- ARYAL, S. Biochemical Test and Identification of *Bacillus subtilis* [www Document]. **Microbiology Info. com.**, 2016.
- CAO XH, LIAO ZY, WANG CL, YANG WY, LU MF. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. **Brazilian Journal Microbiology**;40(2):373-9, 2009.
- CASTILHO L. R; MEDRONHO R. A.; ALVES T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.
- CUI C, SHEN CJ, JIA G, WANG KN. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. **Genetic Molecular Res** 12:1766–1776, 2013.
- CHANG YY, LIU JS, LAI SL, WU HS, LAN MY "Cerebellar hemorrhage provoked by combined use of *nattokinase* and aspirin in a patient with cerebral microbleeds". **International Med.** 47 (5): 467–9, 2008.
- COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.) **Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980**. New York: Academic Press p.621-634, 1981.
- DE OLIVEIRA MN, SIVIERI K, ALEGRO JHA, SAAD SMI. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.
- DE VRIES, Y.P. Minireview- The role of calcium in bacterial spore germination. **Microbes and Environments**, v. 19, n.3. p. 199-202, 2004.
- DE VOS, V. Chapter 4: The identification of *Bacillus* species with special reference to *Bacillus anthracis* in Picard, J.A., Gouws, M.J. and hours Credits, N., **Applied Veterinary Bacteriology and Mycology: Identification of anaerobic bacteria**, 2015.
- EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the compatibility of the microbial preparation *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (BioPlus 2B) with the coccidiostat lasalocid. A sodium in feed for turkeys. **EFSA Journal** 2007; 5(10):573, 5 pp. doi:10.2903/j.efsa.2007.573, 2007.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). **EFSA Journal**; 11(11):3449, 108 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3449, 2013.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2001.

GIANG HH, VIET TQ, OGLE B, LINDBERG JE. Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal microflora in growing-finishing pigs. **Asian Australas Journal Animal Science** **24**: 655–661, 2011.

HOSOI T, AMETANI A, KIUCHI K, KAMINOGAWA S. Improved growth and viability of *lactobacilli* in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or *subtilisin*. **Canadian Journal of Microbiology**. 2000 Oct 1;46(10):892-7.

HUANG, H. GENG, V.R. MIYYAPURAM, C.S. SIT, J.C. VEDERAS, M.M. NAKAN O. **Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity** J Bacteriol, 191, pp. 5690-5696, 2009.

MENG QW, YAN L, AO X, ZHOU TX, WANG JP, LEE JH, KIM IH. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science** 88:3320–3326, 2010.

NACLERIO G, BACCIGALUPI L, CARUSO C, DE FELICE M, RICCA E. *Bacillus subtilis* Vegetative Catalase Is an Extracellular Enzyme. **Applied and environmental microbiology**. Dec 1;61(12):4471-3, 1995.

O'DONNELL, A. G., J. R. NORRIS, R. C. W. BERKELEY, D. CLAUS, T. KANEKO, N. A. LOGAN, AND R. NOZAKI. "Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and API systems." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 30, no. 2: 448-459, 1980.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant

spores cultivated by solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SHENG Q. K., ZHOU K. F., HU H. M., ZHAO H. B., Y. ZHANG, W. YING, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Effect of *Bacillus subtilis* Natto on Meat Quality and Skatole Content in TOPIGS Pigs. 29 (5), 716 - 72, 2016.

USP.24. <1227> Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles. USP 29. **United States Pharmacopeial Convention**. pp. 3053-3055, 2006.

7. CONCLUSÕES FINAIS

A avaliação do desempenho de diferentes subprodutos da agroindústria, principalmente da soja e da cana de açúcar, na esporulação de *B. subtilis var. subtilis* B-3666, por fermentação de estado sólido, que visa o uso direto do fermentado seco e moído, como alimento probiótico, demonstrou que esta composição pode ser usada para produzir esporos probióticos com cepas de *Bacillus sp.* por FES, como parte de uma estratégia economicamente sustentável. A casca de soja e o farelo de soja, bem como sua mistura, e o melaço de soja e o melaço de cana podem ser usados como suporte e substrato, respectivamente, na produção de altas quantidades ($\sim 10^9$ UFC/g de massa seca) de esporos de *B. subtilis natto*. As desvantagens do uso do farelo de soja em relação à casca de soja é o seu maior custo, a produção de odores desagradáveis durante o processo fermentativo e a suscetibilidade à contaminação. Cabe salientar que a casca de soja tem sido classificada como apenas um resíduo de baixo valor, sem utilidade, do processo da indústria de soja por causa de seus baixos nutrientes utilizáveis, sendo esta uma forma alternativa de agregar valor a esse bioproduto e reduzir os custos de matéria primado processo produtivo.

A otimização das condições do processo de fermentação em estado sólido, aplicando os métodos estatístico de planejamento experimental, para aumentar a produção de esporos de *B. subtilis var. subtilis* B-3666 mostrou-se eficaz resultando, após a adição de fontes complementares de nitrogênio, em um aumento de até 02 log/g massa seca (100 vezes) com o uso de melaço de cana como substrato e de até 03 log/g de massa seca (1000 vezes) com o uso de melaço de soja como substrato. Salienta-se que o processo iniciou com 10^9 tendo chegado ao exponencial 10^{13} , valor superior aos reportados na literatura de produtos já existentes no mercado. O melaço de cana foi escolhido como principal substrato para a produção industrial devido a sua maior disponibilidade, com inúmeras empresas que o fornecem em âmbito nacional. Trata-se de um substrato rico em açúcares, concentrada fonte de cálcio, ferro, manganês, selênio, potássio e cobre, baixa susceptibilidade a contaminação desde que adequadamente armazenado, baixo custo e abundante na região sul do país. Possui em sua composição, nutrientes relacionados ao processo esporulativo, como o cálcio (constituente da parede do esporo) e como íons manganês (sal indutor de esporulação), substituindo assim, a necessidade da suplementação com sais indutores de esporulação, o que, por conseguinte, causaria encarecimento do meio.

A avaliação da produção de esporos do *Bacillus subtilis* var. *subtilis* em diferentes tipos de biorreator (frasco, *Bag* e bandejas) a fim de ampliar a produção e maximizar o rendimento através da otimização do processo de produção nos reatores propostos demonstrou que tanto o reator tipo bandeja, como o frasco de vidro de 1000mL, permitiram uma produção de esporos de 10^{12} UFC/g massa seca. O reator tipo bandeja foi escolhido por facilitar o aumento de escala e ser de mais fácil manuseio. A aplicação do planejamento experimental como metodologia de otimização da produção apresentou, como resultado do processo validado o crescimento da produção em 1 log/g (10^{13} UFC/g massa seca), resultando em produtividade ainda não reportada na literatura e redução do tempo de incubação de 05 para 02 dias. .

As condições ideais de cultivo foram determinadas e validadas e estão resumidas no Quadro 13.

QUADRO 13 - CONDIÇÕES DO PROCESSO OTIMIZADO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* B-3666 POR FES.

Variável	Condições ótimas
Reator	Bandeja
Substrato	Melaço de cana :6,0 g%
Inóculo	6,0% (v/v)
pH do substrato pré-esterilização	12,3
pH do substrato pós esterilização	7,0±0,5
Sais de esporulação	Ausente
Suporte	Casca de soja
Tamanho da partícula do suporte	1,18 a 2,0 mm
Umidade pré esterilização	82±4%
Umidade inicial do fermentado (pós esterilização)	70± 5%
Fonte de N	Milhocina (<i>corn steep liquor</i>) 0,3 g%
Altura do leito	3,0 cm
Tempo de incubação	2 dias

A caracterização do produto fermentado tendo como principal parâmetro a caracterização da cepa, a quantidade de células viáveis e estudos de estabilidade, demonstrou que perfil enzimático e bioquímico da cepa utilizada manteve suas principais características pré - e pós fermentação, quando comparado descrito na literatura. Houve poucas alterações fenotípicas, esperadas pós-fermentação por FES e não relatadas como interferentes à ação probiótica do micro-organismo. A quantificação de esporos manteve-se praticamente estável após os processos de moagem e secagem por até 60 dias (tempo máximo do estudo), sendo que a redução de 1 log poderá ser futuramente evitada com

estudos da secagem em outras temperaturas e de condições de embalagem e armazenamento. Mesmo com esta leve redução, o produto apresentou 3 log de esporos/g superior às exigências para comercialização o que impacta positivamente na sua viabilidade econômica. Estes resultados são indicativos de segurança e estabilidade do produto.

O processo desenvolvido apresenta uma série de vantagens, além das citadas, como:

- a) Utilização mínima de inóculo: a cultura starter, utiliza pouco volume de TSB (1%, ou seja 0,036 ml/g de casca de soja), minimizando a quantidade de produto comercial de ativação da cepa;
- b) Os subprodutos principais componentes do meio de cultura utilizados são considerados “estáveis” no que tange aos aspectos de baixa susceptibilidade à contaminação, com alto prazo de validade, desde que armazenados corretamente;
- c) apresenta uma produtividade 3 log/g maior em relação aos produtos similares disponíveis no mercado;
- d) Trata-se de um processo simplificado, com poucas etapas;
- e) Utiliza matéria prima o sem tratamento prévio;
- f) O reator que se utiliza na fermentação (bandeja) é utilizado na secagem, não sendo necessária a troca e lavagem.
- g) O processo desenvolvido é inovador, a ser patenteado, não descrito na literatura, apresenta alta produtividade (10^{13} UFC/g) e baixo custo.

8. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- *Scale-up* com a utilização de reatores de maior capacidade;
- Avaliação da secagem em diferentes temperaturas;
- Determinação da estabilidade do produto nas variáveis de temperatura e umidade, considerando a simulação de estocagem em diferentes zonas climáticas e avaliando a forma de acondicionamento que melhor preserve a viabilidade celular do produto. São também recomendados pelo MAPA três estudos em diferentes temperaturas de estocagem (2-8°C, 20-25 °C e 35- 37 °C);
- Realização de estudo cinética da produção de bacteriocinas, determinar o melhor tempo para a produção dos compostos;
- Realização de estudos de antibiose, baseado na produção de antimicrobianos, com microrganismos patogênicos, analisando em meios de crescimento que permitam a difusão destes compostos;
- Realização de testes da cepa quanto à susceptibilidade a antibióticos recomendados pela EFSA e testes de resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares;
- Realização de estudos *in vivo*, no que tangem à comprovação na melhora dos parâmetros zootécnicos exigidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).
- Determinação da estabilidade da formulação da ração juntamente com o aditivo, quando misturado com uma pré-mistura de ração animal e quando adicionado à ração animal, frente às condições de moagem e granulação.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 314–322, 2012.
- ABU YAZID N, NORAZIAH & BARRENA R, KOMILIS, DIMITRIOS & SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A Review, **Sustainability**. 9. 224., 2017.
- AGERHOLM-LARSEN L., RABEN A., HAULRIK N., et al. Effect of 8-week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**, 54(4): 288-97, 2000.
- ANAGNASTOPOULOS, G. D. and SIDHU, H. The effect of water activity and the aw 256 controlling solute on spore germination of *Bacillus stearothermophilus*. **J. Applied Bacteriology** 257 50:335-349, 1981.
- ANDERSON, S. J.; MERRILL, J. K.; MCDONNELL, M. L.; KLOPFENSTEIN, T. J. Digestibility and Utilization of Mechanically Processed Soybean Hulls by Lambs and Steers. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 11, p. 2965–2976, 1988.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; et al. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83–90, 2007.
- APPELT, M. D.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; et al. Levels of probiotics in animal and vegetal origin feed for broilers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 765–771, 2010.
- APS, L. R. M. M.; DINIZ, M. O; PORCHIA, B. F. M. M.; et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 20, p. 2328–2334, 2015.
- AROWOLO, M. A.; HE, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2018.
- ARYAL, S. Biochemical Test and Identification of *Bacillus subtilis* [www Document]. **Microbiology Info. com.**, 2016.
- ASHLEY VM, MITCHELL DA, HOWES T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Apr 1;3(2):141-50,1999.
- AYALA, F. R.; BAUMAN, C.; COGLIATI, S.; et al. Microbial flora, probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. **Microbial Cell**, v. 4, n. 4, p. 133–136, 2017.

AYUB, M. A. Z. et al. Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos. **Relatório parcial PSPPG**, processo 520712/99-4, 2002.

BEAUCHEMIN KA, MCGINN SM, MARTINEZ TF, MCALLISTER TA. Use of condensed tannin extract from quebrachotrees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**.85:1990–1996, 2007

BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. **Anais**: In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. p. 1. Apinco, 1993.

BHARGAV, S., PANDA, B.P., ALI, M., JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chem. Biochem. Eng. Quarterly** 22, 49e70, 2008. **Biochemical Engineering Journal**, 363 , pp. 1-13, 2003.

BHAT A.R., IRORERE V.U., BARTLETT T., HILL D., KEDIA G., MORRIS M.R., CHARALAMPOPOULOS D., RADECKA I., *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria, 2013.

BITTERN COURT, L. C.; SILVA, C. C. DA; GARCIA, P. D. S. R.; et al. Influence of a probiotic on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2739–2743, 2011.

BLASI, D.A.; DROUILLARD, J.S.; TITGEMEYER, E.C. et al. Soybean hulls: Composition and feeding value for beef and dairy cattle. MF-2438. Kansas State Univ., Manhattan, KS. 2000.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Biores. Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217–225, 2008.

CAO XH, LIAO ZY, WANG CL, YANG WY, LU MF. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. **Brazilian Journal Microbiology**.;40(2):373-9, 2009.

CASADEI, R.M. **Uso racional de antimicrobianos na produção animal**, 2012.

CASSALES, ANA et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675-4683, 2011.

CASTILHO L. R.; MEDRONHO R. A.; ALVES T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CAYUELA, C., KAI, K., PARK, Y.S., IJIMA, S., KOBAYASHI, T. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. **Journal of Fermentation and Bioengineering** **75**, 383–386, 1993.

CAZEMIER AE, WAGENAARS SFM, TER STEEG PF. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from *Bacilli*. **Journal of Applied Microbiology** **90**:761–770, 2001.

CEGLA, U.G., SHUSTER, M. Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof. **United States Patent** 6,913,771, July 5, 2005.

CESARE-VIDAURRE, T., CAMPOS, E., & CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Anais do VII Mexican Congress of Biotechnology and Bioengineering**, Mexico, 1997.

CHANG CW Bioconversion of sugarcane bagasse and soybean hulls for the production of a generic microbial feedstock (**PhD Thesis**). University of Manchester, 2015.

CHANG YY, LIU JS, LAI SL, WU HS, LAN MY "Cerebellar hemorrhage provoked by combined use of *nattokinase* and aspirin in a patient with cerebral microbleeds". **International Med.** 47 (5): 467–9, 2008.

CHEN X, CHEN S, SUN M, YU Z. High yield of poly- γ glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**. 2005;

CHEN, H.; MCGOWAN, E. M.; REN, N.; et al. *Nattokinase*: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. **Biomarker Insights**, v. 13, 2018.

CHEN, ZHEN-MIN et al. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1353-1360, 2010.

CHISTYAKOV, V.; MELNIKOV, V.; CHIKINDAS, M. L.; et al. Poultry-beneficial solid-state *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 fermented soybean formulation. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 34, n. 1, p. 25–28, 2015.

COHN, F. E., Untersuchungen uber Bakterien, Belir. **Bioi. Pf/Inz.**, 1: 124-224, 1872.

COLENUTT, C.; CUTTING, S. M. Use of *Bacillus subtilis* PXN21 spores for suppression of *Clostridium difficile* infection symptoms in a murine model. **FEMS microbiology letters**, v. 358, n. 2, p. 154–161, 2014.

COLLADO, M. C.; GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. Chapter 23 - Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. In: R. R. Watson; V. R. Preedy (Orgs.); **Bioactive Foods in Promoting Health**. p.353–370, Boston: Academic Press. 2010.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.

CORCIONIVOSCHI, NICOLAE & DRINCEANU, DAN & POP, IOAN & STACK, DEIRDRE & STEF, LAVINIA & JULEAN, CĂLIN & BOURKE, BILLY. The Effect of Probiotics on Animal Health. **Animal Science and Biotechnologies**, 43, 2010.

CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S.; MATTOS, E. S. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467–473, 2003.

COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.) **Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980**. New York: Academic Press p.621-634, 1981.

CUI C, SHEN CJ, JIA G, WANG KN. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. **Genetic Molecular Res** 12:1766–1776, 2013.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, 2011.

DAI, C., MA, H., HE, R., HUANG, L., ZHU, S., DING, Q., LUO, L. Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. **LWT** 86, 1–7. 2017

DANCER, B.N., MANDELSTAM, J. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriol* 121, 406–410, 1975.

DE OLIVEIRA MN, SIVIERI K, ALEGRO JHA, SAAD SMI. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

DE VOS, V. Chapter 4: The identification of *Bacillus* species with special reference to *Bacillus anthracis* in Picard, J.A., Gouws, M.J. and hours Credits, N., **Applied Veterinary Bacteriology and Mycology: Identification of anaerobic bacteria**, 2015.

DE VRIES, Y.P. Minireview- The role of calcium in bacterial spore germination. **Microbes and Environments**, v. 19, n.3. p. 199-202, 2004.

DEMIR H, TARI C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2016.

DOMINGUES, C. H. F.; SANTOS, E. T.; CASTIBLANCO, D. M. C.; QUADROS, T. C. O.; PETROLI, T. G.; DUARTE, K. F.; JUNQUEIRA, O. M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação. **Revista Agrocientífica**, v.1., n.1, p. 7-16, 2014

DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 1, p. 1–20, 1999.

DRIKS, A. Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 59, n. 3, p. 389–391, 2002.

DRIKS, A. The *Bacillus* spore coat. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1249–1251, 2004.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2161–2171, 2004.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Solid-State Fermentation . 13, 113–125, 2003.

DWIARTI, L.; OTSUKA, M.; MIURA, S.; YAGUCHI, M.; OKABE, M. Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by *Aspergillus terreus* TN484-M1. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3329–3337, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the compatibility of the microbial preparation *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (BioPlus 2B) with the coccidiostat lasalocid. A sodium in feed for turkeys. **EFSA Journal** 2007; 5(10):573, 5 pp. doi:10.2903/j.efsa.2007.573, 2007.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). **EFSA Journal**; 11(11):3449, 108 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3449, 2013.

EHRENBERG, C. G. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. In **Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835**, pp. 143–336 (in German), 1835.

EIJLANDER, R. T.; DE JONG, A.; KRAWCZYK, A. O.; HOLSAPPEL, S.; KUIPERS, O. P. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D685–D691, 2014.

EL-BISI, H.M.; ORDAL, Z.J. The effect of sporulation temperature on the thermal resistance of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. **Journal of Bacteriology** 71, 10–16, 1956.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

FACCHINI, F. D. A. Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica), Universidade de São Paulo, 2010.

FALLAH, R.; MIRZAEI, E. Effect of adding L-carnitine and Protexin(R) probiotic on performance and some blood parameters of ostrich chickens. **Brazilian Journal of Biology**, v. 3, p. 1–12, 2016.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2002.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2001.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2001.

FIORINI, G.; CIMMINIELLO, C.; CHIANESE, R.; et al. *Bacillus subtilis* selectively stimulates the synthesis of membrane bound and secreted IgA. **Chemioterapia: International Journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy**, v. 4, n. 4, p. 310–312, 1985.

FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do Efeito de Prebióticos (MOS), Probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e Promotor de Crescimento na Alimentação de Frangos de Corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2005.

FOLIGNÉ B., PEYS E., VANDENKERCKHOVE J., VAN HEMEL J., DEWULF J., BRETON J., et al. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. **Clinical And. Nutrition**. 31 p.987–994, 2012.

FONTES, G.C., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova** 31, 2091–2099, 2008.

FUJIYA M., MUSCH M. W., NAKAGAWA Y., HU S., ALVERDY J., KOHGO Y., The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal

homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. **Cell Host And Microbe** **1** p.299–308, 2007.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, 1989.

GANGULY S, NANDI S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal** 102:2–5. doi:10.1016/j.bej.2015.03.020, 2015.

GAO Z, WU H, SHI L, ZHANG X, SHENG R, YIN F & GOONERATNE R. 2017. Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. **Animal Nutrition**, **3**: 109-113. DOI: 10.1016/j.aninu.,2017.

GIANG HH, VIET TQ, OGLE B, LINDBERG JE. Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal microflora in growing-finishing pigs. **Asian Australas Journal Animal Science** **24**: 655–661, 2011.

GIORNO, R.; BOZUE, J.; COTE, C.; et al. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 691–705, 2007.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. **Global Industry Analysts Research Reports**, 2018.

GOLDIN B., GUALTIERI L, MOORE R. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. **Nutrition And Cancer**, 25(2): 197-204, 1996.

GUO, M.; WU, F.; HAO, G.; et al. *Bacillus subtilis* Improves Immunity and Disease Resistance in Rabbits. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

HAGEMAN JH, SHANKWEILER GW, WALL PR, FRANICH K, MCCOWAN GW, CAUBLE SM, GRAJEDA J, QUINONES C. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis* growth, sporulation, and extracellular protease production. **Journal of Bacteriology** 160:438–441 the heat resistance and amount of injury of spores from Bacilli. **J Appl Microbiology** 90:761–770, 1984.

HARWOOD, C. R. *Bacillus*. **Biotechnology Handbooks. 2**. Edited by T. Atkinson & R. F. Sherwood. New York & London: Plenum, 1989.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HMANI, H.; DAOUD, L.; JLIDI, M.; et al. A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 8, p. 1157–1166, 2017.

HOA, T. T.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; et al. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3819–3823, 2001.

HOFFMANN, H. L.; PHARM, D. Gram-Positive Infections, in Pharmacotherapy Self-Assessment Program: Infectious Diseases, 5th Ed. **American College of Clinical Pharmacy**, Kansas City, MO, 2005.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 813–835, 2005.

HONG, H. A.; KHANEJA, R.; TAM, N. M. K.; et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 134–143, 2009.

HOROSHEVA, T. V.; SOROKULOVA, I.; VODYANOY, V. Efficacy of *Bacillus* probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **JMM Case Reports**, v. 1, n. 3, 2014.

HOSOI T, AMETANI A, KIUCHI K, KAMINOGAWA S. Improved growth and viability of *Lactobacilli* in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or *subtilisin*. **Canadian Journal of Microbiology**. 2000 Oct 1;46(10):892-7.

HUANG, J.-M.; LA RAGIONE, R. M.; NUNEZ, A.; CUTTING, S. M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **FEMS Immunology And Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 195–203, 2008.

HUANG, Q.; XU, X.; MAO, Y.; et al. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. **Animal Science Journal Nihon Chikusan Gakkaiho**, v. 84, n. 3, p. 247–252, 2013.

HUANG, X.; LU, Z.; BIE, X.; et al. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, 2007.

IMCOPA IMPORTAÇÃO EXPORTAÇÃO E INDÚSTRIA DE ÓLEOS LTDA.
Frederico José Busato Júnior. **Processo industrial de produção do farelo concentrado de soja e melaço de soja**. PI0704760-6 A2, 30 novembro 2007, 28 julho 2009.

JEONG J. S., KIM I. H.; Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, 2014.

JOSEPH, B.; DHAS, B.; HENA, V.; RAJ, J. Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 942–946, 2013.

JUNG, S.J.; HOUDE, R.; BAURHOO, B.; ZHAO, X.; LEE, B.H. Effects of galacto-oligosaccharides and a *Bifidobacteria lactis*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. **Poultry science**, v.87, n.9, p.1694-1699, 2008.

JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE K.F.; **Probióticos na nutrição de suínos: alternativa ou solução?**, 2007.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M.; M.B, R.; S.U, A. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 361–364, 2004.

KAILASAPATHY K., CHIN J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology And Cell Biology**, 78(1): 80-8, 2000.

KAUR et al., Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* P-2 | **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 17, 125–129, 2001.

KAY, D.; WARREN, S. C. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Morphological changes. **The Biochemical Journal**, v. 109, n. 5, p. 819–824, 1968.

KHOCHAMIT, N.; SIRIPORNADULSIL, S.; SUKON, P.; SIRIPORNADULSIL, W. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. **Microbiological Research**, v. 170, p. 36–50, 2015.

KIM, S.-Y.; KIM, J. Y.; KIM, S.-H.; et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS letters**, v. 581, n. 5, p. 865–871, 2007.

KITAGAWA, M.; SHIRAISHI, T.; YAMAMOTO, S.; et al. Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, *Natto*, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 127, 2017.

KLEIN, C.; ENTIAN, K. D. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied Environ Microbiology*, v. 60, n. 8, p. 2793-2891, 1994.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Bioresearch And Technology**, v. 78, n. 2, p. 123-126, 2001.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 8, n. 2, p. 517-531, 1989.

KRASKO, J. A.; ŽILIONYTĖ, K.; DARINSKAS, A.; et al. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5098-5104, 2018.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Crit. Rev. Biotechnology** 25, 1e30, 2005.

KUBO, Y.; ROONEY, A. P.; TSUKAKOSHI, Y.; et al. Phylogenetic Analysis of *Bacillus subtilis* Strains Applicable to *Natto* (Fermented Soybean) Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6463-6469, 2011.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 5, p. 561-594, 1999.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E.; et al. Probiotics on poultry production. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457-1465, 2014.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrointestinal: aditivos. In: FUNDAÇÃO

LANKAPUTHRA, W. E.; SHAH, N. P. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. **Mutation Research**, v. 397, n. 2, p. 169-182, 1998.

LAU, M. W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 11, 2010.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C. DE; GONZALES, E.; et al. Probiotic in diet or inoculated in fertilized eggs: 1. performance of broiler chicks challenged with *Salmonella Enteritidis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1509-1516, 2010.

LEE, P. C. et al. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 63-67, 2003

LEFEVRE, M.; RACEDO, S. M.; RIPERT, G.; et al. Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. **Immunity & Ageing : I & A**, v. 12, 2015.

LEI, K.; LI, Y.; WANG, Y.; et al. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* B10 on biochemical and molecular parameters in the serum and liver of high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 6, p. 487–495, 2015.

LEVIN, P. A.; GROSSMAN, A. D. Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 630–635, 1998.

LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 406–415, 1981.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

LIMA, T. de. Modelo de inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido. **Dissertação de Mestrado – UFPR**, 2009.

LIU HUA-MIN & HAO-YANG LI. Application and Conversion of Soybean Hulls In "**Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**", book edited by Minobu Kasai, ISBN 978-953-51-3118-2, Print ISBN 978-953-51-3117-5, under CC BY 3.0 license. Published: May 3, 2017.

LIU JG, XING JM, CHANG TS, MA ZY, LIU HZ. Optimization of nutritional conditions for *nattokinase* production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. **Process Biochemistry** 40:2757–2762, 2005.

LIU, Y.-P.; LIU, X.; DONG, L. Lactulose plus live binary *Bacillus subtilis* in the treatment of elders with functional constipation. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 92, n. 42, p. 2961–2964, 2012.

LUEGAS, J.P., ALBINO, J.T., TABERNARI, F., BARROS, V.M., PESSOA, G.S., ROSTAGNO, H.S. Efeito da adição de probióticos na dieta ileal da matéria seca sobre digestibilidade e da proteína de frangos de corte. **Archivos de Zootecnia** 64, 199–204, 2015.

MAHDINIA, E. A. DEMIRCI, A. BERENJIAN. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K2): a new perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(1), 7 pages, 2017.

MAKINEN, K.; BERGER, B.; BEL-RHLID, R.; ANANTA, E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 356–365, 2012.

MARSHALL B.M., LEVY SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**; 24(4):718-33, 2011.

MARTEAU, P. RAMBAUD, JC. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiological Reviews**, 12: 207-20, 1993.

MARTI, M.E., COLONNA, W.J., REZNIK, G., PYNN, M., JARRELL, K., LAMSAL, B., GLATZ, C.E. Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactant by *Bacillus subtilis* on soybean co-products. **Biochemical Engineering Journal** 95, 48–55, 2015.

MARTI. et al. *Bacillus subtilis* está relacionado à produção de biossurfactantes. **Biochemical Engineering Journal**, 44, pp. 13-18, 2015.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209–223, 2015.

MASSI, J. B., & REZENDE, M. I. Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b por Fermentação em Estado Sólido (FES) para a Produção de Biossurfactantes. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2(3esp), 38-41, 2013.

MAZAS, M., LOPEZ, M., GONZALEZ, I., BERNARDO, A. & MARTIN, R. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology** 25, 331–334, 1997.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 109–114, 2010.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 133, n. 1, p. 3–18, 1994.

MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33–44, 2013.

MELO B. Na mira dos antibióticos. **Dinheiro Rural**, 2018.

MENG QW, YAN L, AO X, ZHOU TX, WANG JP, LEE JH, KIM IH. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science** 88:3320–3326, 2010.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., **Solid-state fermentation bioreactors**. Springer-Verlag, Berlin, 2006

MITCHELL, D.; F. VON MEIEN, O.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Group I bioreactors: unaerated and unmixed. In: Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovic, M. (Eds.), Solid-state Fermentation Bioreactors: **Fundamentals of Design and Operation**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 65e76, 2006.

MOLIN G, SVENSSON M. Formation of dry-heat resistant *Bacillus subtilis* var. *niger* spores as influenced by the composition of the sporulation medium. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 42:387-395, 1976.

MONTEIRO, S.M., CLEMENTE, J.J., HENRIQUES, A.O., GOMES, R.J., CARRONDO, M.J.& CUNHA, A.E. A. Procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Prog** 21, 1026-1031, 2005.

NACLERIO G, BACCIGALUPI L, CARUSO C, DE FELICE M, RICCA E. *Bacillus subtilis* Vegetative Catalase Is an Extracellular Enzyme. **Applied and environmental microbiology**. Dec 1;61(12):4471-3, 1995.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. **Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation**. Biotechnology and bioengineering, Vol. 72, 2. 2001

NEWBOLD, CHARLES. **Probiotics for ruminants**, 1996.

NGUYEN, V. A. T.; HUYNH, H. A.; HOANG, T. V.; et al. Killed *Bacillus subtilis* spores expressing streptavidin: a novel carrier of drugs to target cancer cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 6, p. 528-541, 2013.

O'DONNELL, A. G., J. R. NORRIS, R. C. W. BERKELEY, D. CLAUS, T. KANEKO, N. A. LOGAN, AND R. NOZAKI. "Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and API systems." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 30, no. 2: 448-459, 1980.

OETTERER, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1. Ed. São Paulo, 2006.

- OGGIONI, M. R.; POZZI, G.; VALENSIN, P. E.; GALIENI, P.; BIGAZZI, C. Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 325–326, 1998.
- OGUNLEYE A., BHAT A., IRORERE V.U., HILL D., WILLIAMS C., RADECKA I. Poly- γ -glutamic acid: Production, properties and applications. **Microbiology**. **161**:p.1–17, 2015.
- OH, S. M. et al. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus sp.* **Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 509-514, 2007.
- OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. 1. Ed. Science Publishers, South Carolina, USA, 2007
- OKSANEN P.J., SALMINEN S., SAXELIN M., et al. Prevention of travellers' diarrhea by *Lactobacillus* GG. **Annals of Medicine**, 22(1): 53-6, 1990.
- OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; CARICATI, A. T. P.; ABDULACK-LOPES, F.; et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 23, p. 3351–3354, 2012.
- OLMOS, J.; J, P.-M. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 6, n. 7, p. 361–365, 2014.
- OOSTRA, J.; LE COMTE, E. P.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 13–24, 2001.
- OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; et al. On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis* - strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 99–103, 2007.
- PACCEZ J.D., H.D. NGUYEN, W.B. LUIZ, et al. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine** **25**: 4671–4680, 2007.
- PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. DOS S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro - doi: 10.5102/ucs.v14i1.3629. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85–96, 2016.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Solid-State Fermentation., v. 13, n. 2, p. 81–84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state
- PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 86, 2007.

- PARKER R. B., "Probiotics: the other half of the antibiotic story," **Animal Nutrition and Health**, vol. 29, pp. 4–8, 1974.
- PESTKA J.J. Food, diet, and gastrointestinal immune function. **Advances In Food And Nutrition Research**, 37: 1-66, 1993.
- PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579–586, 2004.
- POORMONTASERI, M.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; KALANTARI, T. The effects of probiotic *Bacillus subtilis* on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type a in Caco-2 cell culture. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 150, 2017.
- POSADA-URIBE, L.F., ROMERO-TABAREZ, M. & VILLEGAS-ESCOBAR, V. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. **Bioprocess Biosyst Eng** 38, 1879–1888, 2015.
- PRAZDNOVA, E. V.; CHISTYAKOV, V. A.; CHURILOV, M. N.; et al. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 549–554, 2015.
- PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS microbiology letters**, v. 217, n. 2, p. 133–139, 2002.
- QIN, C.; GONG, L.; ZHANG, X.; et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. **Animal Nutrition**, 2018.
- RASMUSSEN, SIMON & NIELSEN, HENRIK & JARMER, HANNE. The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiology* 73, 1043-1057. **Molecular microbiology**. 73. 1043-57. 10.1111/j.1365-2958.2009.06830.x, 2009.
- REAL, G.; HENRIQUES. A. O. Controle da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, nº 68: 2-12, 2001.
- REINWALD, S.; WEAVER, C. M. Soy Components vs. Whole Soy: Are We Betting Our Bones on a Long Shot? 123. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2312S-2317S, 2010.
- REN, HANG, YA-TING SU, and XIAO-HUA GUO. "Rapid Optimization of Spore Production from *Bacillus Amyloliquefaciens* in Submerged Cultures Based on Dipicolinic Acid Fluorimetry Assay." **AMB Express** 8 (2018): 21. *PMC*. Web. 20 Sept. 2018.
- RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K.; CANAL, C. W.; et al. Effects of prebiotics and probiotics on the colonization and immune response of broiler chickens challenged with

Salmonella enteritidis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 193–200, 2007.

RIESENMAN PJ, NICHOLSON WL. Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation. **Applied and Environmental Microbiology**. 66(2): 620-626, 2000.

RINGEL, Y.; RINGEL-KULKA, T. The Intestinal Microbiota and Irritable Bowel Syndrome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 49, p. S56, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, **Casa do Pão Editora**, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.
SAHA BC Hemicellulose bioconversion. **Journal Ind Microbiology Biotechnology**30:279-291, 2003.

SALMINEN, ISOLAURI S., SALMINEN E. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 5: 53-6, 1996.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95–104, 2002.

SANDERS, M. E.; HAMILTON, J.; REID, G.; GIBSON, G. A nonviable preparation of *Lactobacillus acidophilus* is not a probiotic. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 6, p. 886, 2007.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *SporoLactobacillus*, and *BreviBacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 101–110, 2003.

SANDERS, M. Probiotics. **Food Technology**, 53(11): 67-77, 1999.

SANTOS, G. DE LOS; RODRIGO, J.; TURNES, C. G. Probiotics in aviculture. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741–747, 2005.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL CR. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*’ thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Appl Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SELLA SRBR, GUIZELINI BP, VANDENBERGHE LPS, MEDEIROS ABP, SOCCOL C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology** 82:1019–1026, 2009.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 533–545, 2015.

SELLA, SANDRA REGINA BR et al. Soybean molasses-based bioindicator system for monitoring sterilization process: Designing and performance evaluation. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 18, n. 1, p. 75-87, 2013.

SEO, S.H., CHO, S.-J., HONG, Y.-H., RYU, J.-H., KANG, J.H., CHI, H., PARK, S.-W., PYUN, Y.R., CHO, S.C., KOOK, M.C., PARK, H.H. Method for preparing a fermented soybean meal using *bacillus* strains. **WO2011031020A2**, 2011.

SHARIF, A. et al. The Role of Probiotics in the Treatment of Dysentery: a Randomized Double-Blind Clinical Trial. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, 2017.

SHENG Q. K., ZHOU K. F., HU H. M., ZHAO H. B., Y. ZHANG, W. YING, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Effect of *Bacillus subtilis* Natto on Meat Quality and Skatole Content in TOPIGS Pigs. 29 (5), 716 - 72, 2016.

SHEWALE, R. N.; SAWALE, P.; KHEDKAR, C.; SINGH, A. Selection criteria for probiotics: A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 9, p. 17–22, 2014.

SHI, F. & ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. **Biocontrol** 52, 845–853, 2007.

SHIM, Y. H.; SHINDE, P. L.; CHOI, J. Y.; et al. Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 23, n. 4, p. 521–529, 2010.

SHIM, Y. H.; SHINDE, P. L.; CHOI, J. Y.; et al. Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 23, n. 4, p. 521–529, 2010.

SHIMIZU, M. Functional Food in Japan: Current Status and Future of Gut-Modulating Food. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, p. 4, 2012.

- SIDHU, M; VAN DER POORTEN, D. The gut microbiome. *Australian Family Physician*; 46(4):206-211, 2017.
- SHOBHARANI, P. PADMAJA R.J., HALAMI P.M.. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512 **Res. Microbiology**, 166 (6), pp. 546-554, 2015.
- SILVA, JOSÉ ALEXSANDRO et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.
- SINGHANIA R.R., PATEL A.K. , SOCCOLC.R. , PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, pp. 13-18, 2009.
- SNEE, R.D. Think Strategically for Design of Experiments Success. **BioProcess International**, March 2011
- SOCCOL CR, DA COSTA ES, LETTI LA, KARP SG, WOICIECHOWSKI AL, DE SOUZA VANDENBERGHE LP. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**. Mar 22, 2017.
- SPIER M.R. , L.P.S. VANDENBERGHE, MEDEIROS A.B.P. , SOCCOLC.R. **Application of different types of bioreactors in bioprocesses**, 2016.
- SPINOSA, M. R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 361–368, 2000.
- STEINKRAUS, K. H. **Industrialization of indigenous fermented foods**, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, 2004.
- STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Revista Visão Agrícola – USP/ESALQ**, n. 13, p. 146-150, Jul/Dez, 2015.
- STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T. DE; GOMES, R. C.; et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181–194, 2007.
- STULKE, J, and W. HILLEN. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. **Annu. Reviews Microbiology** 54:849–880, 2000.
- SUN, H.; LIN, Z.; ZHAO, L.; et al. *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate. **Parasites & Vectors**, v. 11, 2018.
- SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5851–5855, 2010.

SUVA, M. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. **Journal of Current Research in Scientific Medicine**, v. 2, p. 65–72, 2017.

TAKEDA, K.; SASAKI, K.; OKUMURA, K. Extract of metabolic products of *Bacillus subtilis* AK augments natural killer cell cytotoxic activity. **Traditional & Kampo Medicine**, v. 3, n. 2, p. 100–106, 2016.

TAM N.K.M., et al.. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of Bacteriology** 188(7): p. 2692–2700, 2006.

TAN, I. S.; RAMAMURTHI, K. S. Spore formation in *Bacillus subtilis*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 3, p. 212–225, 2014.

TANG, Q.; YIN, K.; QIAN, H.; et al. Cyclic di-GMP contributes to adaption and virulence of *Bacillus thuringiensis* through a riboswitch-regulated collagen adhesion protein. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28807, 2016.

TEITELBAUM J., WALKER W. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**, 22: 107-38, 2002.

THOMAS, L., LARROCHE, C., PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. Journal** 81, 146e161. **World Journal of Microbiology**.

TOMPKINS, T. A.; XU, X.; AHMARANI, J. A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 93–106, 2010.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

USP 24. Chapter 55. Biological indicators resistance performance tests. In: The United States Pharmacopeia. 29rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convention, 2006.

USP 24. Chapter 55. Biological indicators resistance performance tests. In: **The United States Pharmacopeia. 29rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convention**, 2006.

USP.24. <1227> Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles. USP 29. **United States Pharmacopeial Convention**. pp. 3053-3055, 2006.

- UYENO, Y., S. SHIGEMORI, AND T. SHIMOSATO. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and Environments**. 30: 126-132, 2015.
- VASANTHA N, FREESE E. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. **Journal Genetic Microbiology** 112:329–336, 1979.
- VAZQUEZ, A. P. *Bacillus* species are Superior Probiotic Feed-Additives for Poultry. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 2, n. 3, 2016.
- VUKOVIĆ, M. *Bacillus subtilis* IP 5832 (Flonivin BS) shortens the duration of the carrier state in patients with acute non-typhoid salmonella enteritis. **Medicinski Pregled**, v. 54, n. 1–2, p. 62–68, 2001.
- WALLACE R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**. 72199429923003, 1994.
- WANG, C. L.; NG, T. B.; YUAN, F.; LIU, Z. K.; LIU, F. Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis natto* T-2. **Peptides**, v. 28, n. 7, p. 1344–1350, 2007.
- WANITSCHKE R., GOERG K.J., LOEW D. Differential therapy of constipation--a review. **International Journal Clinical Pharmacology And Therapeutics**, 41(1): 14-21, 2003.
- WARRINER, K. AND WAITES, W. M. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on Medium containing Glucose: Ribose. **Letters in Applied Microbiology**, 29, 97-102, 1999.
- WENG, Y.; YAO, J.; SPARKS, S.; WANG, K. Y. *Nattokinase*: An Oral Antithrombotic Agent for the Prevention of Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.
- WESSFLL, W. S. Caracterização De G-Pga Produzido Por *Bacillus subtilis* BL53. Recuperado em 05/08/2018, de Lume, 2015.
- WESTSTRATE, J. A.; VAN POPPEL, G.; VERSCHUREN, P. M. Functional foods, trends and future. **The British Journal of Nutrition**, v. 88 Suppl 2, p. S233-235, 2002.
- WOLFENDEN, R.E. & PUMFORD, NEIL & MORGAN, M.J. & SHIVARAMAIAH, SRICHAITANYA & WOLFENDEN, A.D. & PIXLEY, C.M. & GREEN, J & TELLEZ, GUILLERMO & HARGIS, B.M.. Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and Salmonella reduction in commercial turkey brooding houses. **Poultry Science**, 2011.
- WU, Y.; SHAO, Y.; SONG, B.; et al. Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, p. 9, 2018.
- XU, D.; CÔTÉ, J.-C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. Pt 3, p. 695–704, 2003.
- YANAGISAWA Y, CHATAKE T, CHIBA-KAMOSHIDA K, NAITO S, OHSUGI T, SUMI H, YASUDA I, MORIMOTO Y. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of *nattokinase* from *Bacillus subtilis natto*. Acta Crystallographica Section F **Structural Biology Crystallization Communications** 2010;66:1670-1673, 2010.
- YING, W., ZHU, R., LU, W., GONG, L. A new strategy to apply *Bacillus subtilis* MA139 for the production of solid-state fermentation feed. **Letters in Applied Microbiology** 49, 229–234. 2009.

- ZAGHARI, M.; ZAHROOJIAN, N.; RIAHI, M.; PARHIZKAR, S. Effect of *Bacillus Subtilis* Spore (GalliPro[®]) Nutrients Equivalency Value on Broiler Chicken Performance. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 1, p. 3555, 2015.
- ZHANG, W., QIU, L., GONG, A., CAO, Y., WANG, B. Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. **BioResources** 8, 1124–1135. <https://doi.org/10.15376/biores.8.1.1124-1135>, 2013.
- ZHANG, W., QIU, L., GONG, A., CAO, Y., WANG, B. Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. **BioResources** 8, 1124–1135. <https://doi.org/10.15376/biores.8.1.1124-1135>, 2013.
- ZHANG, Y.-R.; XIONG, H.-R.; GUO, X.-H. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 1, p. 31–36, 2014.
- ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 155, p. 343 – 347, 2013.
- ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 155, p. 343 – 347, 2013.
- ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 155, n. 2, p. 343–347, 2013.
- ZHAO S, HUN N, HUANG J, LIANG Y, ZHAO B. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. **Biotechnology Letters** 30:295–297. doi: 10.1007/s10529-007-9540-1, 2008.
- ZHAO S, HUN N, HUANG J, LIANG Y, ZHAO B. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. **Biotechnology Letters** 30:295–297. doi: 10.1007/s10529-007-9540-1, 2008.
- ZHENG S, TAN W, FENG L, LUO Z, XU T, ZHANG D, TAN S. Optimization of sporulation fermentation process of *Bacillus subtilis* NTGB-178. **Journal of Nanjing Agricultural University**; 40(6):1031-40, 2017.
- ZHOU, D.; ZHU, Y.-H.; ZHANG, W.; et al. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics generates Tr1 cells in weaned F4ab/acR– pigs challenged with an F4+ ETEC/VTEC/EPEC strain. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 95, 2015.
- ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. Control of Established *Salmonella typhimurium* Intestinal Colonization with in vivo-Passaged Anaerobes. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 183–188, 1993.